

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Allocation du carbone entre les polysaccharides pariétaux et de réserve chez les végétaux: détection immunologique de la sucrose synthase et de l'ADP-glucose pyrophosphorylase chez Cichorium intybus L.

DAEMS, Alexandre

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX NAMUR

Faculté des Sciences

**Allocation du carbone entre les polysaccharides pariétaux et de réserve chez les
végétaux : détection immunologique de la sucrose synthase et de l'ADP-glucose
pyrophosphorylase chez *Cichorium intybus* L.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Alexandre Daems

Septembre 2002



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX NAMUR

Faculté des Sciences

**Allocation du carbone entre les polysaccharides pariétaux et de réserve chez les
végétaux : détection immunologique de la sucrose synthase et de l'ADP-glucose
pyrophosphorylase chez *Cichorium intybus* L.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Alexandre Daems

Septembre 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joellejonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Allocation du carbone entre les polysaccharides pariétaux et de réserve chez les végétaux
: détection immunologique de la sucrose synthase et de l'ADP-glucose pyrophosphorylase
chez *Cichorium intybus* L.**

DAEMS Alexandre

Résumé

Ce mémoire a pour but de cerner l'implication de deux enzymes clés du métabolisme des glucides, la sucrose synthase (SuSy) et l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), dans l'allocation du carbone chez la chicorée. Ces deux enzymes interviennent respectivement dans la synthèse des polysaccharides pariétaux et du polysaccharide de réserve qu'est l'amidon. Nous avons mis au point une technique de détection de ces enzymes en Western blot, basée sur la combinaison de l'immunomarquage et de la fluorescence, faisant appel à l'utilisation de polysérums anti-SuSy et anti-AGPase reconnus par des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes Alexa. Notre méthode de détection a d'abord été validée par l'utilisation de SuSy et d'AGPase recombinantes en dot-blot et Western-blot. Elle a ensuite été utilisée pour la mise en évidence de SuSy et d'AGPase dans des extraits de protéines solubles de radis et de chicorée. Les deux enzymes ont bien été détectées dans les jeunes feuilles de radis. Nos résultats indiquent par contre l'existence de différences tissulaires de localisation de ces enzymes chez la chicorée : la SuSy n'est pas détectée dans les jeunes feuilles mais bien dans les racines, alors que l'AGPase est détectée à la fois dans les feuilles et les racines. Ces résultats nous ont ensuite permis d'émettre des hypothèses quant aux rôles probables de la SuSy et de l'AGPase chez la chicorée.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 2002

Promoteur: P. VAN CUTSEM

Felix qui potuit rerum cognoscere causas

(Heureux celui qui a pu pénétrer les causes secrètes des choses)

Virgile

Au terme de mes études, mes très chaleureux remerciements vont à monsieur le professeur Van Cutsem qui m'a fait l'honneur et le plaisir d'accepter la direction de ce travail de fin d'études, m'a ouvert les portes de son laboratoire et m'a assisté de ses conseils éclairés.

J'adresse aussi mes vifs remerciements aux membres du jury, J-J Letesson, S. Pirotton, G. Trausch, A. Decreux pour leur lecture et leur évaluation de ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement et très vivement madame le Docteur Françoise Liners qui en sa qualité de tutrice et avec beaucoup de patience de compétence et de talent m'a initié à la recherche scientifique. Ses conseils avisés et son expérience m'ont été très précieux.

Un merci appuyé à tous les membres de l'unité (Johan, Françoise, Pierre, Mallory, Annabelle, Olivier, Laurence, Alexis, Elisabeth, Philippe, Cécile, Jean-Michel, Catherine, Nicolas et Françoise) pour leurs avis judicieux, leur sympathie et leur bonne humeur au quotidien.

Je remercie tous mes amis qui, au cours de ces années d'études, ont toujours été présents dans les bons comme dans les moins bons moments et plus spécialement Yann, Ludo et Jean-Michel.

Merci à Audrey pour sa présence attentive et efficace.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement mes parents qui avec une remarquable constance m'ont toujours épaulé et plus particulièrement encore lors de la rédaction de ce mémoire

Table des abréviations

1-FFT : fructane 1-fructosyltransferase.
1-SST : sucrose 1-fructosyltransferase.
3-PGA : 3-phosphoglycerate.
6PGDH : 6-phosphogluconate dehydrogenase.
Ac : anticorps.
actine-F : actine filamenteuse.
actine-G : actine globulaire.
ADN : acide désoxyribonucléique.
ADP : adénosine diphosphate.
ADP-G : ADP-glucose.
Ag : antigène.
AGPase : ADP-glucose pyrophosphorylase.
AGPase rec. : AGPase recombinante
APS : amonium persulfate.
ARN : acide ribonucléique.
ARNm : ARN messenger.
ATP : adénosine triphosphate.
BSA : Bovine serum albumin
CCD : Charge Coupled Device
CDPK : Cytidine triphosphate kinase.
DF : Discriminating filter
DTT : Dithiothreitol
ECF : enhanced chemifluorescence.
ECL : enhanced chemiluminescence.
EDTA : Ethylenediamine tetraacetic acid
F2,6BP : Fructose-2,6-biphosphatase.
F2,6P kinase : Fructose 2,6-phosphate kinase.
F6P : Fructose 6-phosphate.
FK : fructokinase.
G1P : Glucose 1-phosphate.
G6P : Glucose 6-phosphate.
G6P : Glucose 6-phosphate.
G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase.
GBSS : granule bound starch synthase.
Hexoses-P : Hexoses phosphates.
HK : hexokinase.
IP : inhibiteurs de protéases.
IPTG : isopropyl- β -D-thiocalactoside.
JAP : jours après floraison.
kDa : kilodalton.
K_i : constante d'inhibition.
KJ : Kilo joule.
K_m : constante de Michaelis.
L-AGP : grande sous-unité de l'AGPase.
LP : long-pass
Lys : lysine.
M : molaire.
ml : millilitre.
mM : millimolaire.
mol : mole.
NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduite.
NI : nanomètre.
Nm : nanomètre.

PAGE : électrophorèse en gel de polyacrylamide.
Pb : paire de bases.
PBS : phosphate buffered saline.
PFK : ATP-dependent phosphofructokinase.
PFP : pyrophosphate-dependent phosphofructokinase.
Pi : Phosphate inorganique.
PM : poids moléculaire.
PPi : ion pyrophosphate.
PVDF : polyvinylidene fluoride.
PVPP : Polyvinyl pyrophosphate.
Rpm : rotation par minute.
RUBISCO : ribulose biphosphate carboxylase / oxygenase.
S-AGP : petite sous-unité de l'AGPase.
SDS : dodécylsulfate de sodium.
SPP : Sucrose phosphate phosphatase.
SPS : Sucrose phosphate synthase.
SURE : Sucrose responsive element.
SuSy : sucrose synthase.
SuSy rec. : SuSy recombinante.
TBS : Tris buffered saline.
TBST : tris buffered saline tween.
TEMED : N,N,N',N'-tetraméthyl-éthylènediamide.
Trioses-P : Trioses phosphates.
UDP : Uridine diphosphate.
UDP-G : UDP-glucose.
UV : ultra-violet.
V : volts.

Table des matières

I. INTRODUCTION	2
1 Introduction générale	2
1.1 Le métabolisme des végétaux.....	2
1.2 Vue générale du métabolisme des glucide.....	4
1.3. Contrôle de l'allocation des trioses-P vers la synthèse d'amidon ou de saccharose	6
2. Le pool d'hexoses phosphates.....	8
3. Le métabolisme du saccharose	10
3.1 Le saccharose	10
3.2 La synthèse de saccharose par la sucrose phosphate synthase	10
3.3 Les rôles du saccharose	11
Le saccharose et la transduction du signal.....	11
Le saccharose et le transport d'énergie via le phloème.....	13
3.4 les enzymes de dégradation du saccharose	15
4. La sucrose synthase (SUSY)	17
4.1 Rôles de l'enzyme.....	19
La sucrose synthase alimente la synthèse des polysaccharides	19
La sucrose synthase et les organes consommateurs	23
4.2. Les isoenzymes	25
4.3. Modulation de l'expression de la sucrose synthase	26
Contrôles transcriptionnels	26
Contrôle post-traductionnel.....	28
4.4. La localisation de la sucrose synthase	28
5. Le métabolisme de l'amidon.....	29
5.1 L'amidon, l'amylose et l'amylopectine	29
5.2. La synthèse d'amidon.....	31
6. L'adp-glucose-pyrophosphorylase ou agpase	33
6.1. Rôle de l'adp-glucose pyrophosphorylase	34
6.2 les isoenzymes de l'agpase	36
6.3. Modulation de l'expression de l'agpase	37
6.4. La localisation.....	37
7. L'allocation du carbone chez <i>cichorium intybus</i>	39
8. L'immunodétection	40
9. L'immunomarquage en western blots	41
II. OBJECTIFS DU MEMOIRE	44
III. MATERIEL ET METHODES	46
1. Production des protéines recombinantes	46
1.1. Mise en culture des stocks bactériens	46
1.2. Culture de vérification.....	46
1.2.1. Petite culture de 5ml	46
1.2.2. Extraction des protéines au départ de 500 ml de suspension bactérienne.....	47
1.3. Culture en vue de l'isolement de la protéine d'intérêt par le « t7-tag affinity purification kit » (novagen)	47
1.3.1. Culture d'induction en vue de l'extraction des protéines d'intérêts	47
1.3.2. Extraction des protéines insolubles (protocole novagen).....	48
1.3.3. Purification des protéines avec le « t7-tag affinity purification kit »	48

2. Analyse des protéines	49
2.1. Electrophorèse en gel sds-page (méthode de laemmli)	49
2.2. Western-blotting	52
2.3. Immunomarquage après dot et western blots	52
Dot- blot	53
Western-blot.....	53
3. Extraction de protéines végétales	54
4. Dosage des protéines	55
4.1. La méthode bradford.....	55
4.2. Nanorange ® protein quantification kit	55
 IV RESULTATS ET DISCUSSION.....	58
1. Production et purification de SUSY et d'agpase	58
1.1. Vérification de l'expression des protéines recombinantes en bactéries	58
1.2. Purification des protéines recombinantes	60
2. Mise au point de la technique de marquage	62
2.1. Principe du marquage et de la détection.....	62
2.2. Détection en dot-blot	64
2.3. Détection en western-blot	66
2.4. La sensibilité de la méthode de détection.....	68
Mise au point d'une technique de détection de la SuSy et de l'agpase recombinante : premières conclusions.....	68
3. mise au point de la détection de SuSy et d'agpase dans des extraits de protéines végétales	70
3.1. détection de la SuSy et de l'agpase dans des extraits de protéines de radis	70
3.2. Détection de la SuSy et de l'agpase dans des extraits de protéines de chicorée	76
Conclusion générale concernant la détection de la SuSy et de l'agpase dans les extraits végétaux.....	77
 V DISCUSSION GENERALE.....	79
1. Rôles de la SuSy dans le métabolisme des glucides chez la chicorée : hypothèses	80
Cas des feuilles de chicorée	80
Cas de la racine de chicorée	82
2. Rôles de l'agpase dans le métabolisme des glucides chez la chicorée : hypothèses	84
Cas des feuilles de chicorée	84
Cas de la racine de chicorée	85
 VI PERSPECTIVES	87
1. Susy	87
2. Agpase	87
3. Immunodétection.....	88
 VII BIBLIOGRAPHIE.....	90

INTRODUCTION

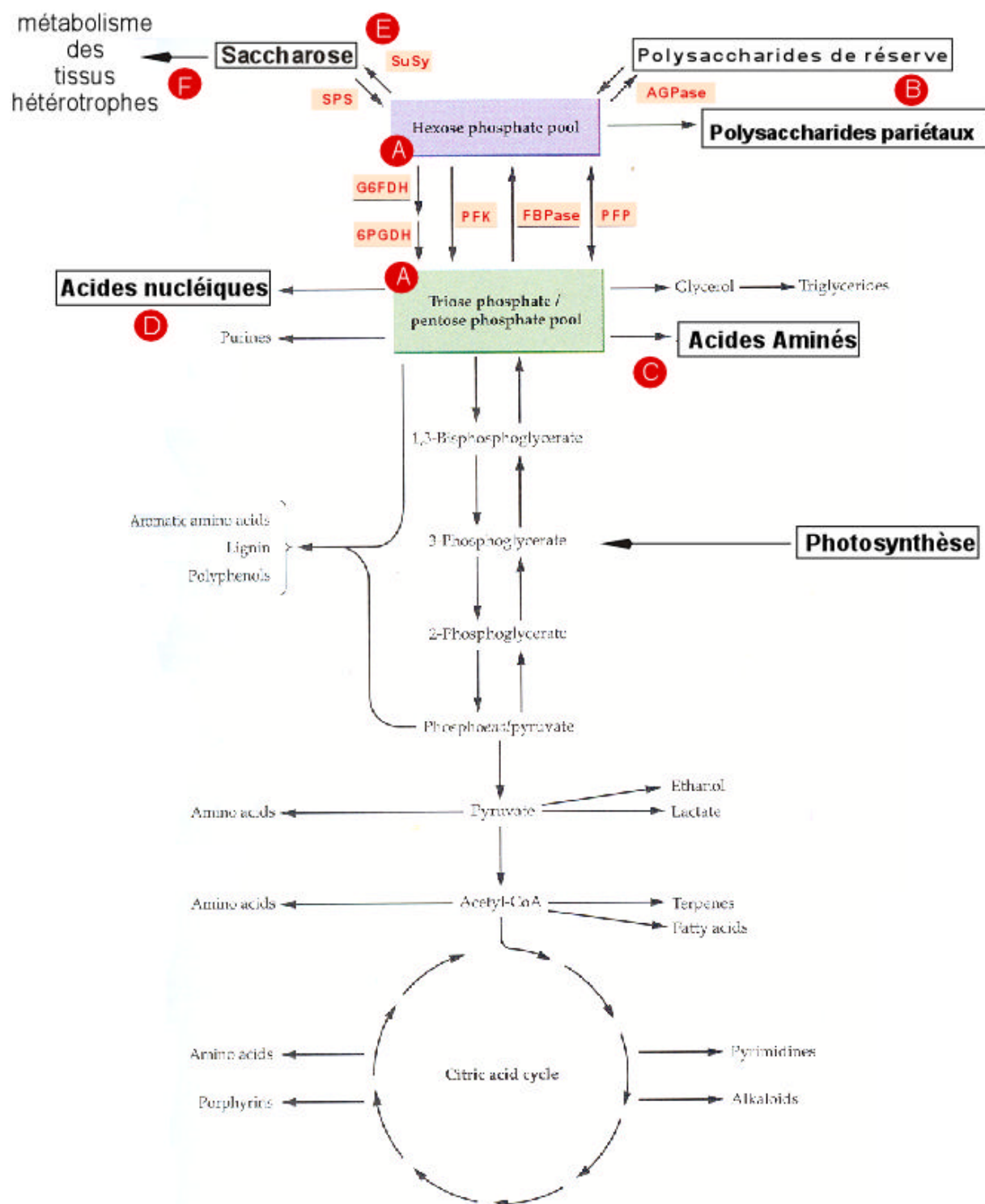


Figure 1: Métabolisme des glucides : vue générale d'après Buchman *et al.*, 2000.

Ce métabolisme est composé de deux pools principaux : hexoses et trioses phosphates (A) qui fournissent en substrat différentes voies de synthèse comme celle des polysaccharides pariétaux (ex: la cellulose) et de réserve (ex: l'amidon ou l'inuline) (B), des acides aminés (C), des acides nucléiques (D). Le saccharose synthétisé (E) peut aussi être transporté dans les tissus hétérotrophes (F) (abréviations des enzymes voir liste).

I Introduction

1. Introduction générale

Au cours de cette recherche, nous nous sommes intéressés à l'allocation du carbone réduit lors de la photosynthèse. Ce composé, indispensable au développement des végétaux, est utilisé dans le métabolisme des glucides dont on connaît aujourd'hui les principales enzymes et réactions (Sheen *et al.*, 1999) (Figure 1).

1.1 Le métabolisme des végétaux

Les végétaux se distinguent par plusieurs caractéristiques leur conférant des atouts non négligeables dans leurs milieux de vie. Ces atouts, dont un bref aperçu est repris ci-dessous, sont finalement liés, de près ou de loin, au métabolisme des glucides (Buchanan *et al.*, 2000).

?? **La photosynthèse** : Les végétaux captent la lumière et utilisent son énergie pour fixer et réduire le dioxyde de carbone. Les oses synthétisés, organisés en deux pools principaux (trioses phosphates et hexoses phosphates) (Figure 1, A), peuvent ensuite fournir localement du carbone réduit principalement nécessaire à la synthèse des polysaccharides, des protéines et des acides nucléiques (Figure 1, B, C, D). Ces oses peuvent aussi être convertis en saccharose (Figure 1, E) afin d'être exportés dans les différentes parties de la plante (racines et fruits) (Figure 1, F). Cette voie permet un apport d'énergie dans les tissus hétérotrophes. Il est intéressant de savoir que seulement 55% des cellules foliaires sont photosynthétisantes et donc capables de synthétiser leur propre énergie et de fixer, grâce à elle, le carbone atmosphérique. Les autres cellules, qui sont incapables de fixer et de réduire ce carbone, bénéficient donc d'un apport de carbone sous forme de saccharose (Kutschera et Heiderich, 2002).

?? **Les plastes** : Dans les cellules végétales, nombre de réactions du métabolisme énergétique se déroulent dans les plastes, telles que la formation de molécules d'ATP et de NAD(P)H (énergie utilisée dans toutes les réactions de réduction ou de synthèse moléculaire) ainsi que la fixation du CO₂ atmosphérique. Les plastes ont donc une grande importance métabolique. Outre leurs rôles dans la photosynthèse (chloroplastes), les plastes sont impliqués dans la synthèse des acides gras, des acides aminés et de l'amidon (amyloplastes).

Les plastes sont entourés de deux membranes, l'une interne et l'autre externe. Plusieurs transporteurs antiports ont déjà été caractérisés dans la membrane interne dont le plus connu est celui des trioses phosphates qui permet le transfert de ceux-ci vers la synthèse de saccharose dans le cytosol (Gerrits *et al.*, 2001). La membrane externe ne contient pour sa part que des canaux porine-like non-spécifiques. Elle est donc considérée comme non sélective et perméable à de nombreuses petites molécules. L'existence de tous ces transporteurs et canaux est à la base de la régulation entre les voies présentes dans le cytosol et dans les plastes.

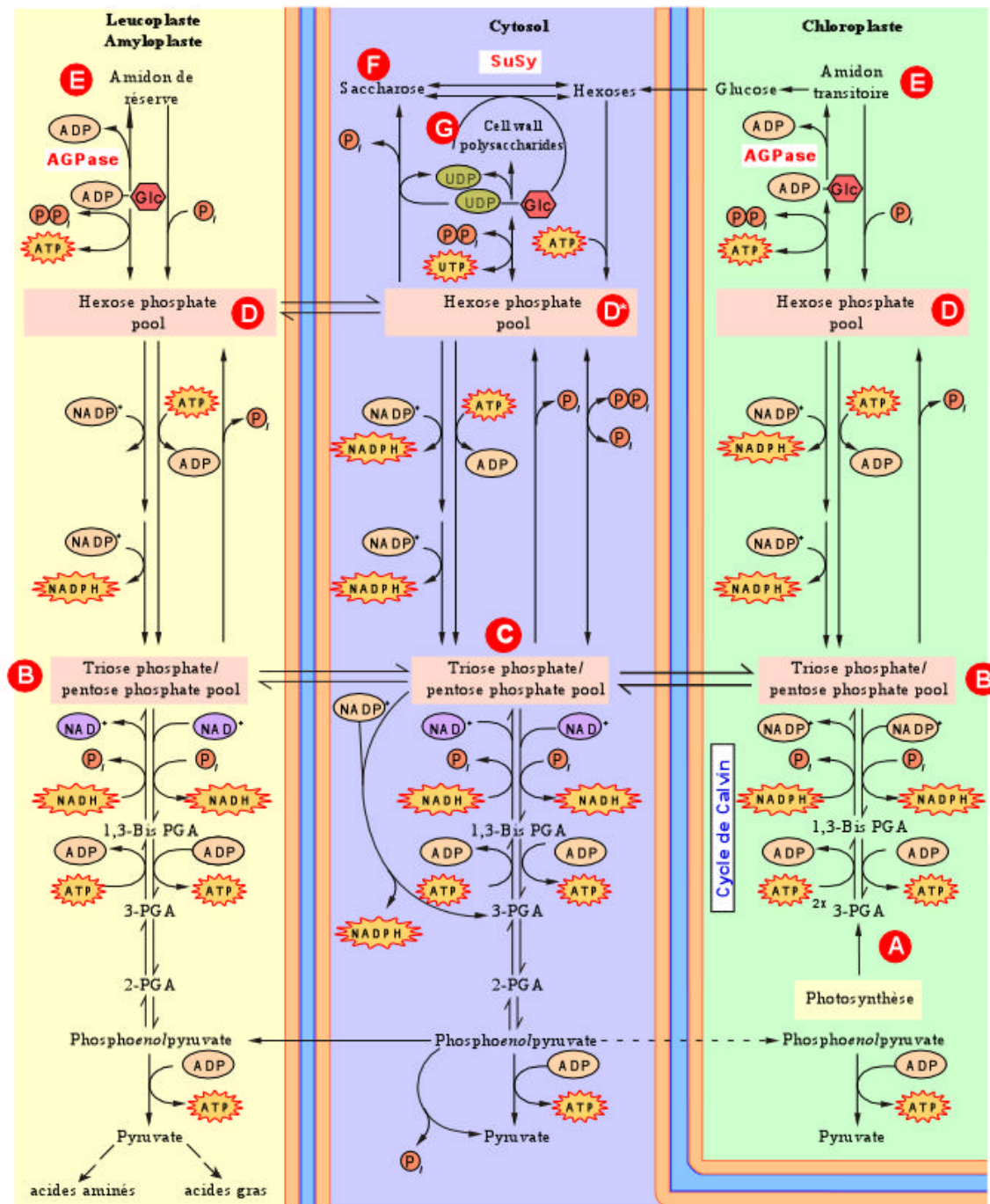


Figure 2 : Voies d'entrée du carbone dans le métabolisme des sucres d'après Buchnam *et al.*, 2000

Dans les chloroplastes la fixation du CO₂ par la RUBISCO libère du 3-phosphoglycérate (3-PGA) (A) qui, suite à son passage dans le cycle de cycle de Calvin, peut entrer dans le pool de trioses-P plastidique(B). Ces trioses peuvent ensuite soit être exportés dans le cytosol (C) soit être dirigés vers le pool d'hexoses-P plastidiques (D) nécessaire à la synthèse d'amidon transitoire ou de réserve (E). Dans le cytosol, les trioses-P sont transformés en hexoses-P cytosolique (D*) qui peuvent ensuite être utilisés dans la synthèse de saccharose (F) ou dans la synthèse des polysaccharides pariétaux (G).

?? **La paroi cellulaire** : Cette dernière est composée essentiellement de cellulose, d'hémicelluloses et de pectines. La synthèse de ces composés représente une des plus importantes utilisations des sucres et monopolise jusqu'à plus de 30% du métabolisme cellulaire (Figure 1, B) (Buchanan *et al.*, 2000).

Ces caractéristiques qui sont aussi des contraintes, vont de pair avec une flexibilité remarquable du métabolisme des plantes. C'est en raison de cette flexibilité que les végétaux peuvent s'adapter à de nombreux types de milieux (sec, humide, tropical...). Cette faculté d'adaptation se manifeste principalement dans l'organisation du métabolisme des glucides (saccharose, polysaccharides pariétaux, de réserve) dont les réactions de synthèse et les fonctions de transport, de consommation et de stockage sont tributaires des conditions environnementales et du stade de développement (Sheen *et al.*, 1999).

1.2 Vue générale du métabolisme des glucides

La photosynthèse permet d'accumuler de l'énergie sous forme d'ATP et de NADPH. Ces molécules sont utilisées pour réduire le CO₂ atmosphérique fixé par la ribulose biphosphate carboxylase / oxygénase (RUBISCO) au cours du cycle de Calvin. Cette fixation libère deux molécules de 3-phosphoglycérate (3-PGA) (Figure 2, A). Le cycle de Calvin permet finalement la libération d'une molécule de glycéraldéhyde 3-phosphate (Duffus et Duffus, 1984). Les triglycérides ainsi formés constituent un pool de trioses phosphates (Figure 2, B) qui peuvent être soit :

- i) exportés vers le cytosol (Figure 2, C) où, après transformation en hexoses-P (Figure 2, D*), ils sont utilisés dans la synthèse de saccharose et de polysaccharides pariétaux (Figure 2, F, G).
- ii) convertis dans les plastes en fructose-6-phosphate (F6P) en vue de la synthèse d'amidon (figure 2, E).

Le transfert des trioses-P vers le cytosol se fait par l'intermédiaire d'une protéine membranaire qui assure un antiport de stricte stœchiométrie : un phosphate inorganique du cytosol s'échange avec un triose phosphate plastidique.

Dans les plastes comme dans le cytosol, les étapes qui mènent à l'apparition de F6P sont identiques et font intervenir une aldolase et une fructose 1,6 bi-phosphatase (Figure 3 B). Le F6P synthétisé peut ensuite être converti en glucose-6-phosphate puis en glucose-1-phosphate (Figure 3, D). Ces trois intermédiaires forment un pool d'hexoses phosphates qui, dans les plastes, est utilisé pour la synthèse d'amidon transitoire et de réserve (Figure 2, E). Dans le cytosol ce même pool sert à la synthèse du saccharose et des polysaccharides pariétaux (Figure 2, F, G) (Pollock *et al.*, 1999).

Mais dans quelles conditions se fait réellement le choix de l'orientation des triose-P vers la synthèse de saccharose ou d'amidon ?

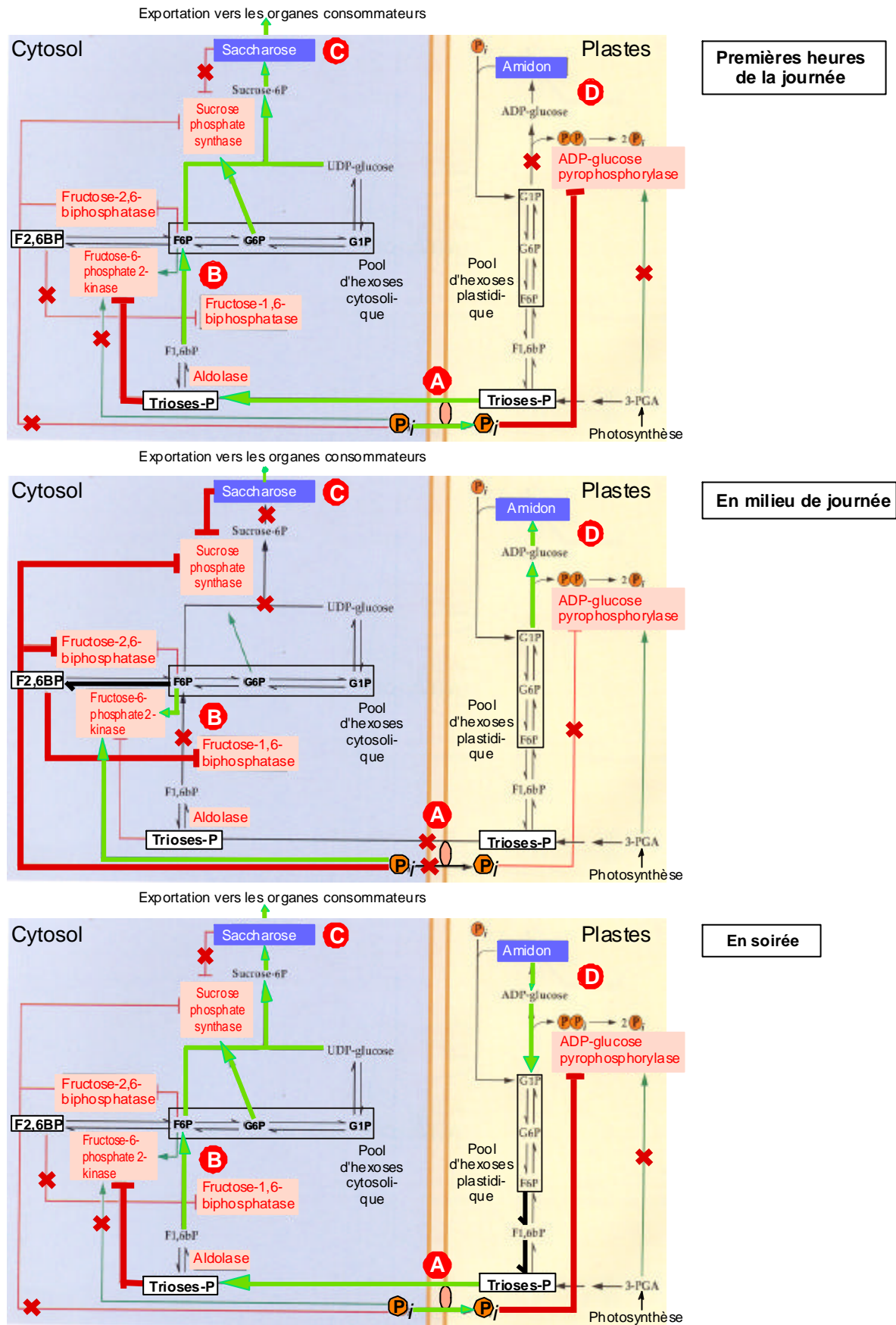


Figure 3 : Allocation des trioses-P entre la synthèse d'amidon et de saccharose durant différentes phases de la journée d'après Buchanan *et al.*, 2000 (pour plus de détail, voir texte)

1.3. Contrôle de l'allocation des trioses-P vers la synthèse d'amidon ou de saccharose

La plante doit pouvoir faire face à des variations importantes en apport de nutriments entre le jour et la nuit, ce qui implique un contrôle strict de son métabolisme. Le phosphate inorganique (Pi) et le fructose-2,6-biphosphate (F2,6BP) sont deux molécules importantes dans le contrôle de l'allocation des trioses-P chez les végétaux.

Durant les premières heures de la journée, la photosynthèse est active et les trioses-P sont exportés des chloroplastes vers le cytosol en échange de Pi (Figure 3, A). Cette exportation des trioses-P vers la voie de synthèse du saccharose, qui les rend indisponibles pour la synthèse d'amidon (Figure 3, E), est donc contrôlée par la disponibilité du phosphate cytosolique (Geigenberger *et al.*, 1998). Les trioses-P du cytosol sont ensuite transformés en fructose-6-phosphate (F6P) substrat de la synthèse de saccharose qui, par interconversion, produit du glucose-6-phosphate (G6P) activateur de la sucrose phosphate synthase (SPS), enzyme principale de la synthèse du saccharose (Figure 3, B). Le saccharose synthétisé est alors directement exporté vers des organes consommateurs (Cfr point 3.3. les rôles du saccharose). Une forte quantité de trioses-P dans le cytosol maintient un niveau basal faible en F2,6BP, autre molécule qui contrôle la voie de synthèse du saccharose en bloquant la synthèse de F6P par liaison au site actif de la fructose-1,6-biphosphatase.

En milieu de journée, lorsque l'intensité de la synthèse du saccharose dépasse les capacités d'exportation, ce dernier s'accumule dans le cytosol et bloque la sortie des trioses-P hors du chloroplaste par une série de rétro-inhibitions en chaîne (Figure 3, C). D'autre part, l'accumulation de F6P, causé par l'accumulation de saccharose, active une F2,6P-kinase responsable de la formation de F2,6BP qui joue alors son rôle d'inhibiteur de la synthèse de F6P (cfr ci dessus) (Figure 3, B). La diminution de l'importation de trioses-P dans le cytosol bloque toute exportation des Pi vers les chloroplastes. Une telle accumulation de Pi provoque une inhibition de la SPS d'une part et favorise l'augmentation du niveau de F2,6BP d'autre part (Farré *et al.*, 2000) (Figure 3, A). L'accumulation de trioses-P dans les chloroplastes y déclenche alors la synthèse d'amidon (Figure 3, D).

En soirée, lorsque la photosynthèse diminue, la synthèse de trioses-P diminue elle aussi. Les trioses phosphates provenant de la dégradation de l'amidon (Figure 3, D) sont alors exportés vers le cytosol (Figure 3, A) où ils relancent la synthèse du saccharose en diminuant la quantité de Pi cytosolique (Figure 3, B,C). L'amidon peut aussi directement être hydrolysé en glucose qui peut être exporté dans le cytosol avant d'entrer dans le pool d'hexoses phosphates après phosphorylation (Figure 2, E). L'amidon dit transitoire des chloroplastes est en fait principalement utilisé en fin de journée et durant les nuits afin de couvrir les demandes en saccharose des différents organes de la plante (Farré *et al.*, 2001).

La quantité de Pi dirige donc l'exportation des trioses phosphates dans le cytosol alors que le fructose-2-6-biphosphate sert d'agent de contrôle de la synthèse de saccharose à partir du pool d'hexoses phosphates. Les

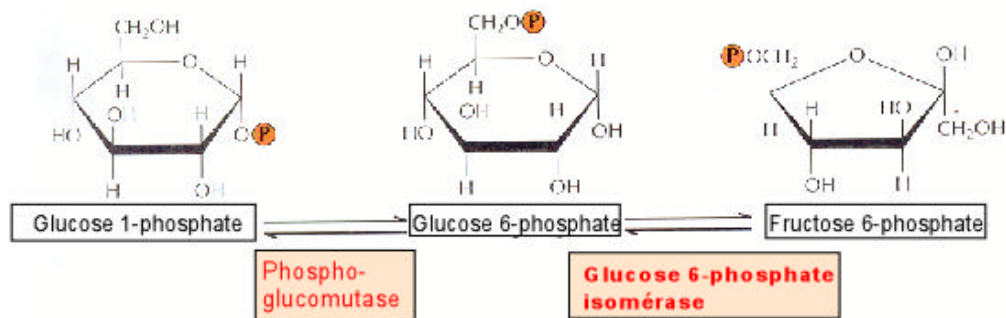


Figure 4 : Le pool d'hexoses phosphates d'après Buchanan *et al.*, 2000

Le pool d'hexoses est composé de trois molécules le glucose 1- phosphate, le glucose 6-phosphate et le fructose 6-phosphate dont l'interconversion implique deux enzymes particulières : la phosphoglucomutase et la glucose 6-phosphate isomérase. Ce pool est à la fois présent dans le cytosol et dans les plastes. Situation générale de ce pool dans le métabolisme des glucides, voir figure 2, D.

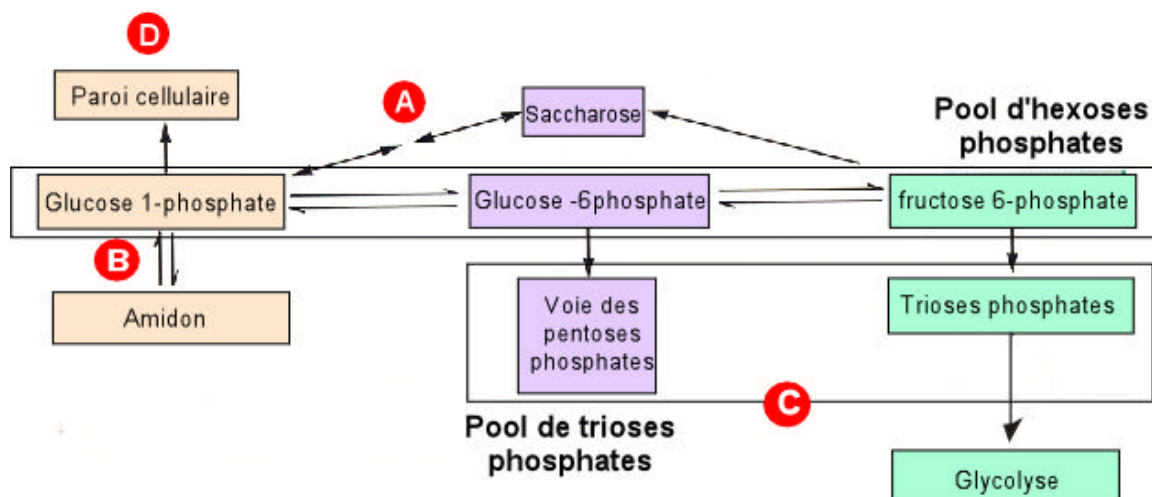


Figure 5 : Le rôle central du pool d'hexoses-P dans le métabolisme des glucides d'après Buchanan *et al.*, 2000

Le pool d'hexoses-P, occupent une place centrale dans le métabolisme des glucides. Il est utilisé et alimenté par la synthèse et la dégradation du saccharose (figure 5 A), et de l'amidon (figure 5, B). Les hexoses-P sont aussi utilisés pour la glycolyse, le cycle des pentoses (Figure 5, C) et la synthèse de polysaccharides en particulier les composés pariétaux (figure 5, D). Pour une vision plus détaillée, voir figure 2.

trioses exportés des chloroplastes sont donc stockés temporairement sous forme de saccharose dans le cytosol des cellules chlorophylliennes avant d'être amenés vers les organes hétérotrophes. Le stockage sous forme d'amidon n'intervient que dans un second temps, afin d'éviter les pertes du surplus de carbone (Ferne *et al.*, 2002).

Nous pouvons donc retenir que ces deux voies biochimiques (synthèse de saccharose et d'amidon) constitutives du métabolisme des glucides chez les plantes, se présentent comme un système de deux pools d'intermédiaires métaboliques liés par des réactions enzymatiques réversibles dont l'équilibre dépend des besoins métaboliques du végétal à un moment donné. Le premier pool comporte des hexoses phosphates, et le second des intermédiaires de la voie des pentoses et des trioses phosphates (Figure 1 A) qui peuvent être convertis en acides aminés, en acides gras (Figure 1, B, C) ou encore être oxydés pour former de l'ATP et du NADH. Dans ce qui suit, nous allons présenter plus particulièrement le pool d'hexoses phosphate en raison de son rôle central dans le métabolisme des sucres.

2. Le pool d'hexoses phosphates

Le pool d'hexoses phosphates est formé de trois intermédiaires : le glucose-6-phosphate, le glucose-1-phosphate et le fructose-6-phosphate. « L'interconversion » équilibrée de ces intermédiaires fait intervenir la phosphoglucomutase et la glucose-6-phosphate isomérase (Figure 4).

Ces hexoses-P, ainsi que les sucres diphosphonucléosidiques (UDP-glucose, ADP-glucose), occupent une place centrale dans le métabolisme des cellules végétales, et plus spécifiquement des cellules non chlorophylliennes. Le pool d'hexoses phosphates est alimenté par la dégradation des glucides - saccharose (Figure 5 A), amidon (Figure 5, B) et autres polysaccharides de réserve tels que les polyfructanes - la néoglucogenèse et la photosynthèse dans le cas des cellules photosynthétiques. Les hexoses-P sont utilisés pour la glycolyse, le cycle des pentoses-P (Figure 5, C) (qui aboutissent à la synthèse du NADPH) et la synthèse de polysaccharides, en particulier les composés pariétaux (Figure 5, D).

Les cellules contiennent deux pools d'hexoses phosphates localisés respectivement dans le cytosol et dans les plastes (amyloplast dans le cas des cellules non chlorophylliennes) (Figure 2, B et D). Ces deux pools sont mis en relation par un transporteur de la membrane interne des plastes (Keeling *et al.*, 1988).

Deux molécules importantes, le saccharose et l'amidon ont donc un rôle majeur dans la constitution de ce pool d'hexoses phosphates. Au cours de ce travail, nous nous intéresserons principalement à ces deux sucres et à leur métabolisme, qui fait intervenir deux enzymes clés, à savoir la sucrose synthase (SuSy) pour le métabolisme du saccharose, et l'ADP-glucose pyrophosphorylase (ADPGase) pour celui de l'amidon (Figure 2).

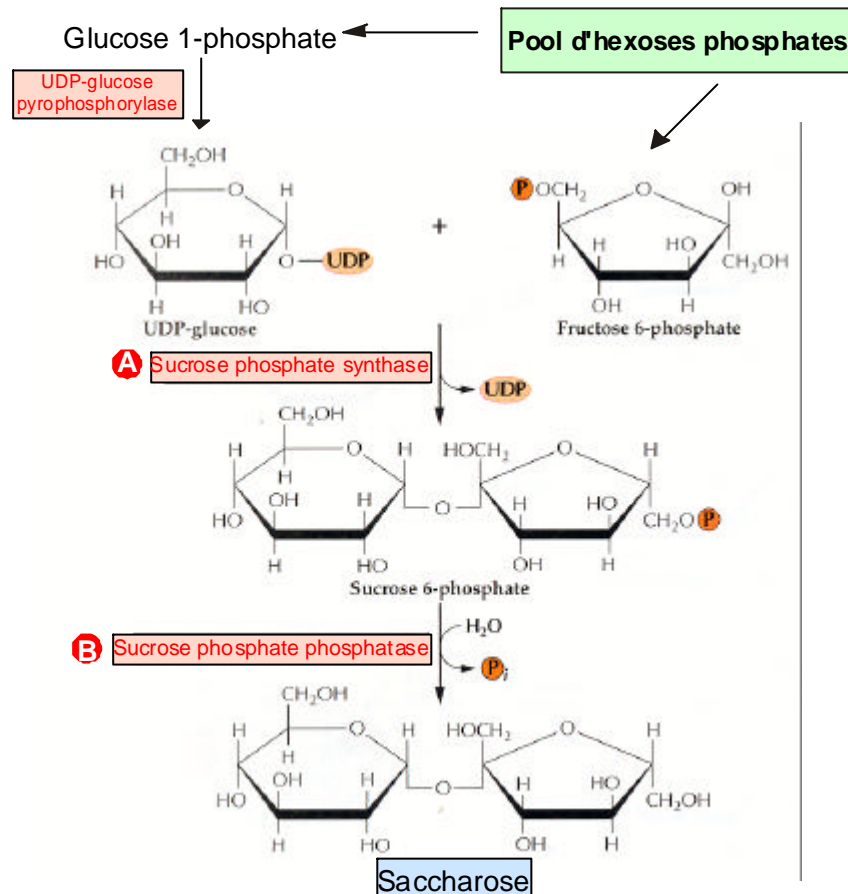


Figure 6 : La synthèse de saccharose d'après Buchanan *et al.*, 2000.

La synthèse de saccharose à partir de d'UDP-glucose et de fructose 6-phosphate fait intervenir deux enzymes la Sucrose phosphate synthase (SPS) (A) et la Sucrose phosphate phosphatase (SPP) (B). Pour une vision du rôle de cette voie dans le métabolisme des sucres voir figure 2,

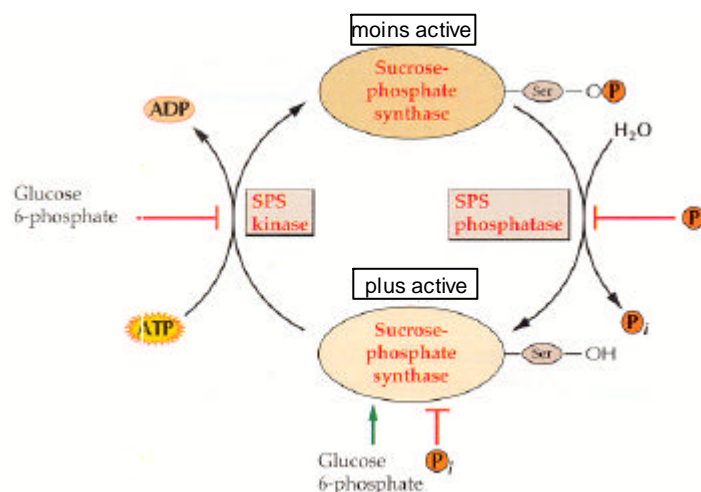


Figure 7 : La régulation de la SPS, enzyme clé de la synthèse de saccharose d'après Buchanan *et al.*, 2000.

La SPS est inhibée par le P_i et activée par le G6P. Un contrôle supplémentaire de cette enzyme s'effectue par une SPS kinase qui phosphoryle la SPS ce qui a pour conséquence de la rendre moins active. Cette kinase est inhibée par le G6P. Une SPS phosphatase peut enlever un phosphate à la SPS et ainsi la rendre active. Cette phosphatase est inhibée par le P_i

3 Le métabolisme du saccharose

3.1 Le saccharose

Le saccharose n'est pas seulement le produit majeur de la photosynthèse, il représente aussi la forme sous laquelle le carbone réduit est transporté dans toute la plante à partir des feuilles jusqu'aux organes utilisateurs (racines, fleurs, graines, tubercules...). Le saccharose permet de constituer des réserves temporaires d'énergie. Il ne constitue des réserves durables que chez quelques espèces particulières dont la canne à sucre, la betterave et l'érable à sucre où le taux de sucre peut aller jusqu'à 15 à 20% du poids frais (Martin *et al.*, 1993).

Le saccharose est enfin perçu comme un régulateur, pouvant influencer la transcription de certains gènes.

3.2 La synthèse de saccharose par la sucrose phosphate synthase

Pour rappel, la synthèse de saccharose s'opère dans le cytosol au départ d'hexoses phosphates (glucose-1-phosphate). Ces derniers proviennent soit des trioses phosphates dérivés des chloroplastes (Figure 2, C), soit d'hexoses cytosoliques synthétisés à partir du glucose émanant de la dégradation de l'amidon transitoire des chloroplastes (Figure 2, E).

La synthèse du saccharose s'opère grâce à l'intervention de deux enzymes aux réactions bien distinctes :

- ?? la *sucrose phosphate synthase* (SPS) transforme l'UDP-glucose (provenant de la transformation du glucose-1-phosphate par l'intermédiaire de l'UDP-glucose pyrophosphorylase) et le fructose-6-phosphate (provenant du pool d'hexoses phosphates) en saccharose-6-phosphate et en UDP (Figure 6, A).

Cette SPS, enzyme clé de la synthèse de saccharose, est inhibée par le P_i et activée par le glucose-6-phosphate. Un contrôle supplémentaire s'effectue par une kinase régulatrice (SPS kinase) qui phosphoryle la SPS pour la rendre moins active. Cette kinase est inhibée par le glucose-6-phosphate. Une SPS phosphatase peut enlever le phosphate et activer ainsi la SPS. Cette phosphatase est bien sûr inhibée par le phosphate inorganique (Figure 7).

Dans les feuilles, les variations de la synthèse de saccharose sont associées avec les changements de l'état d'activation de la SPS. La SPS joue aussi un rôle important dans les organes non-photosynthétiques où elle détermine la concentration en saccharose (Weber *et al.*, 1996).

- ?? la *sucrose phosphate phosphatase* déphosphoryle ensuite le saccharose-6-phosphate en saccharose (Figure 6, B)

La première réaction, déjà favorable à la production du saccharose, est encore plus résolument orientée dans ce sens par la déphosphorylation de son produit, le saccharose-6-phosphate.

Cette voie est donc totalement irréversible ($\Delta G^0 = -25 \text{ kJ / mol}$) et constitue la voie dominante de synthèse du saccharose. Il existe toutefois une voie annexe qui implique l'action d'une autre enzyme, la sucrose synthase (SuSy), sur laquelle nous reviendrons plus en détail ultérieurement.

3.3 Les rôles du saccharose

Le saccharose et la transduction du signal

Le phénomène de distribution des photoassimilats - connu en anglais sous le nom de "assimilate partitioning" - est crucial pour la croissance des plantes et leur productivité. Certaines études font état de l'existence d'un processus de "sugar sensing" (détection des teneurs en sucres), capable de modifier la distribution des assimilats en fonction des changements extérieurs. C'est ainsi que beaucoup de plantes répondent à une déficience en nutriments et en eau en redirigeant le carbone assimilé vers les racines afin d'y activer leur développement et ainsi augmenter leur capacité d'absorption. La régulation de ce phénomène est régie par une voie de transduction du signal dépendant de la concentration en sucres qui peut modifier l'activité de transport et le niveau d'expression de certains transporteurs (Chiou et Bush, 1998).

La capacité des végétaux à détecter les variations de concentration en saccharose leur permet de réguler leur métabolisme et leur développement. Ces variations de concentration peuvent par exemple modifier l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans des processus essentiels comme la photosynthèse, la glycolyse, le métabolisme du saccharose et de l'amidon... (Rook *et al.*, 2001 ; Delrot *et al.*, 2000).

Dans certains cas le rôle du saccharose est joué par des hexoses tels que le glucose et le fructose. La répression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la photosynthèse par le saccharose peut, par exemple, être provoquée par de faibles concentrations en hexoses (Sheen *et al.*, 1999).

Toutefois, le processus utilisé par les végétaux pour détecter leur concentration interne en sucres et y répondre n'est encore que partiellement connu. Une hexokinase a ainsi été proposée comme messenger central dans le phénomène de sugar sensing : un végétal présentant une forte concentration en hexokinase affiche une sensibilité accrue au glucose qui se traduit par l'augmentation de l'expression de certains gènes (comme ceux codant pour des transporteurs de trioses-P,...) intervenant dans la photosynthèse (Halford *et al.*, 1999). Une protéine végétale, similaire à la protéine kinase SNF1 de levure nécessaire à l'expression de gènes réprimés par le glucose, a aussi été identifiée. Cette protéine interviendrait dans l'expression de gènes végétaux sensibles au glucose (Rook *et al.*, 2001). Des CDPK, des protéines phosphatase, des MAPkinases ainsi que de nombreux facteurs de transcription sont autant de protéines qui ont été répertoriées comme pouvant intervenir dans cette voie de transduction très complexe (Coruzzi et Zhou, 2001).

Enfin, au niveau moléculaire, certaines séquences sensibles aux glucides, ont été mises en évidence à l'intérieur du promoteur de certains gènes induits ou réprimés par les glucides. C'est le cas des boîtes SURE 1 (AATAGAAA) et SURE 2 (AATACTAAT). Le taux de transcription d'un gène dont le promoteur contient ces boîtes, augmente en réponse à une déplétion en saccharose (Delrot *et al.*, 2000).

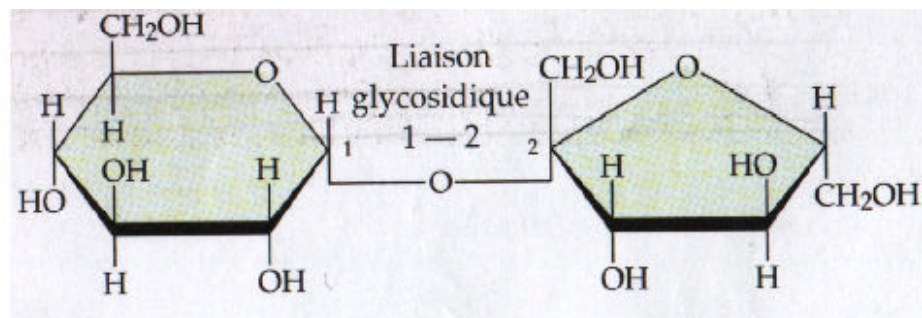


Figure 8 : La molécule de saccharose

Le saccharose est un disaccharide composé de glucose et de fructose. La liaison glycosidique réalisée entre les carbone α -1 du glucose et β -2 du fructose confère des propriétés particulières au saccharose.

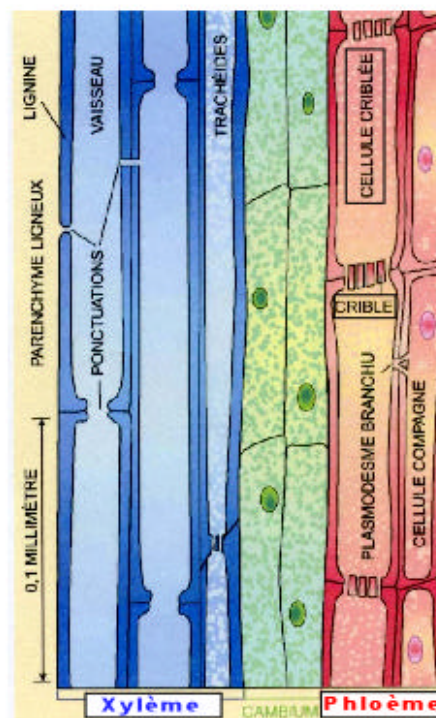


Figure 9: Système vasculaire de la plante

Le système vasculaire des végétaux est composé de deux réseaux particuliers. Le xylème qui transporte l'eau des racines aux feuilles et le phloème qui transporte la sève élaborée des feuilles vers les différents organes consommateurs de la plante (racines, fruits, jeunes feuilles). Le phloème est composé de cellules spécialisées qui sont assemblées bout à bout (cellules criblées). Des parois poreuses, les cribles, séparent les cellules de ces tubes et facilitent la circulation de la sève élaborée.

Le saccharose et le transport d'énergie via le phloème

Le saccharose, molécule très soluble et non ionisée, est sans effet sur la majorité des réactions du métabolisme. Il doit cette inertie au pont osidique qui réunit les carbones α -1 du glucose et β -2 du fructose (Figure 8). Il en résulte : (a) une liaison osidique riche, 1555.02 KJ / mol ce qui rend le saccharose difficile à cliver ; (b) une molécule non réductrice. Le saccharose constitue donc une forme de réserve et de transport aux qualités exceptionnelles, n'intervenant dans le métabolisme que lorsqu'il est hydrolysé en glucose et fructose. Ce sont les raisons pour lesquelles le saccharose constitue la forme principale de transport du carbone réduit sur de longues distances entre les organes photosynthétiques et les organes consommateurs (fruits, organes en croissance, racines...). Plus de 80% du carbone fixé est transporté par le système vasculaire de la plante vers les organes consommateurs où le saccharose fournit l'énergie nécessaire au développement des cellules hétérotrophes (Guignard, 2000).

Remarque :

Un organe source est généralement alimenté par les organes sources les plus proches. Les feuilles supérieures d'une branche peuvent envoyer les glucides à l'extrémité de la pousse, tandis que les feuilles les plus basses envoient les glucides aux racines. Il est aussi intéressant de savoir que les besoins nutritifs d'un fruit en croissance sont tels que celui-ci monopolise tous les organes sources qui l'entourent. Ce n'est toutefois que lorsque les feuilles sont photosynthétiquement autosuffisantes qu'elles exportent leurs surplus carbonés sous forme de saccharose, via le phloème (Guignard, 2000).

Le saccharose n'est pas transporté seul mais avec des acides aminés, des hormones, certains ions et une faible quantité d'eau. Cet ensemble porte le nom de sève élaborée et circule dans le phloème qui fait partie du système vasculaire des végétaux. Chez les Angiospermes, les cellules spécialisées du phloème qui assurent le transport, sont disposées bout à bout et forment les tubes criblés. Des parois poreuses, les cribles, séparent les cellules de ces tubes et facilitent ainsi la circulation de la sève élaborée (Campbell, 1995) (Figure 9).

Le saccharose produit dans les cellules du mésophylle d'une feuille doit migrer vers les tubes criblés avant d'être exportés vers les organes cibles. Chez certaines espèces de menthes et de courges, le saccharose peut circuler tel quel du mésophylle aux tubes criblés en empruntant le symplasma (ensemble des cytoplasmes des cellules), et passe donc d'une cellule à l'autre par les plasmodesmes (Weschke *et al.*, 2000) (Figure 10 a, A).

Chez d'autres espèces, le saccharose atteint les tubes criblés en empruntant les voies symplasmiques et apoplasmiques (au travers des parois). Dans les feuilles de maïs, le saccharose diffuse à travers le symplasma des cellules du mésophylle. Lorsqu'il se rapproche des tubes criblés et des cellules compagnes, le saccharose quitte le symplasma (Figure 10 a, B) et emprunte la voie apoplasmique pour atteindre les parois des cellules compagnes et des tubes criblés. Il traverse ensuite ces parois et se retrouve dans le cytoplasme des cellules compagnes (qui le transportent ensuite vers les tubes criblés par l'intermédiaire des plasmodesmes) et des tubes

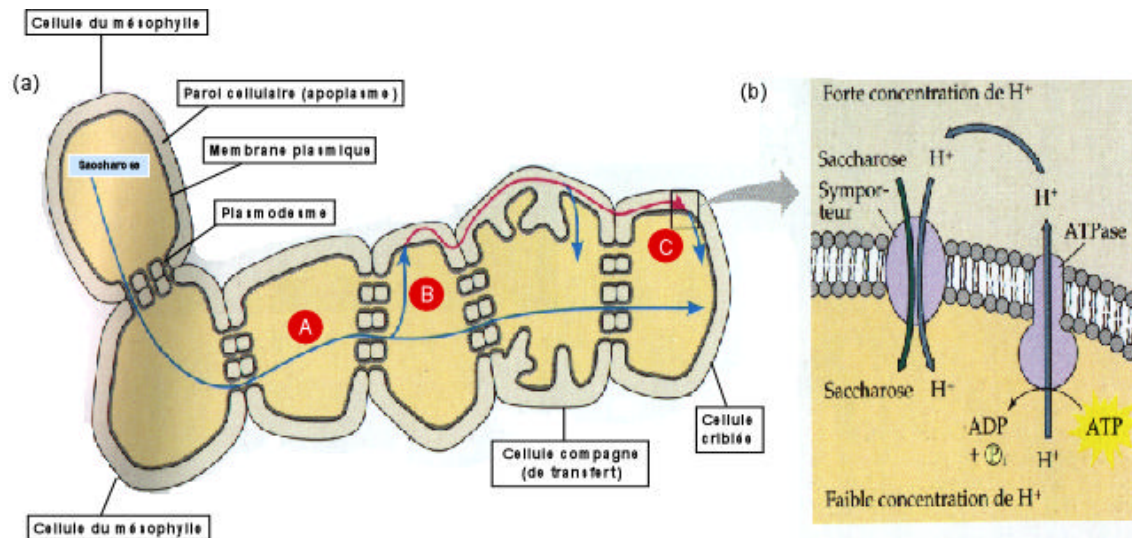


Figure 10 : Le chargement du phloème d'après Campbell, 1995.

(a) Le saccharose produit dans les cellules du mésophylle peut emprunter la voie symplasmique (A) pour se rendre aux tubes criblés. Chez certaines espèces, le saccharose sort du symplasme près des tubes criblés, passe dans l'appoplasme (B) et s'accumule dans les tubes criblés et leurs cellules compagnes. Quelques cellules compagnes, comme celle présentée ici, comportent des replis de la paroi qui augmente la surface membranaire interne affectée au transport des solutés.

(b) Un mécanisme chimiosmotique est responsable du transport du saccharose dans les cellules compagnes et les tubes criblés. Les pompes à protons génèrent un gradient électrochimique de H^+ qui provoque le passage à travers la membrane du saccharose accumulé à l'aide d'une protéine intramembranaire (symporteur) qui couple le transport de saccharose à la diffusion des protons retournant dans la cellule.

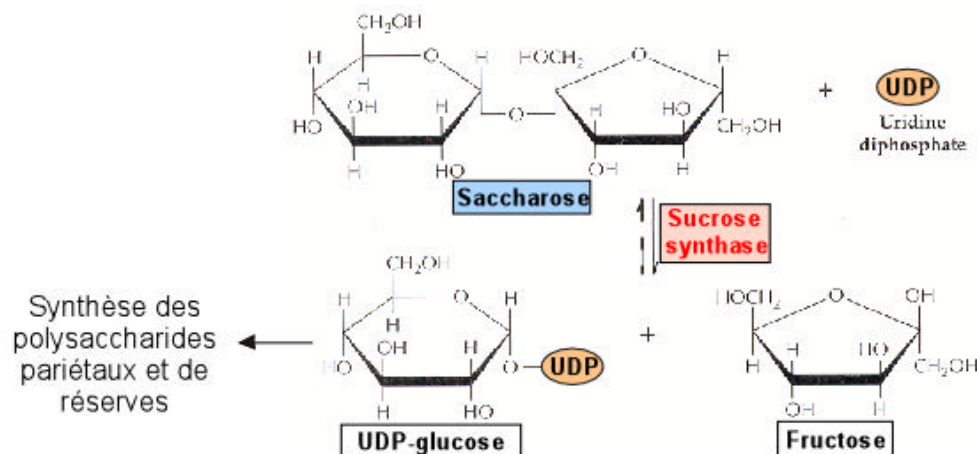


Figure 11: Rôle de la sucrose synthase d'après Buchanan et al., 2000.

La sucrose synthase catalyse le transfert d'un résidu glucose provenant d'une molécule de saccharose vers une molécule d'UDP. Elle permet alors la synthèse d'UDP-glucose et de fructose. L'UDP-glucose est alors utilisé dans la synthèse des polysaccharides pariétaux et de réserves.

criblés où il s'accumule (Nakai *et al.*, 1999). Chez certains végétaux, la paroi des cellules compagnes forme de nombreux replis intracellulaires. Ce type d'adaptation augmente la surface de contact et favorise le transfert de solutés entre l'apoplasme et le symplasme. Ces cellules modifiées sont appelées cellules de transfert (Figure 10).

Chez certaines espèces, les tubes criblés emmagasinent le saccharose dans le symplasme jusqu'à ce qu'il atteigne des concentrations deux à trois fois plus élevées que dans le mésophylle. Le remplissage du phloème nécessite dès lors un transport actif qui implique une pompe à protons (Figure 10 a, C). Grâce à l'ATP, cette pompe, fait sortir les protons de la cellule et emmagasine de l'énergie en maintenant un gradient électrochimique des deux côtés de la membrane plasmique. Un cotransporteur de saccharose / H^+ , protéine clé de la distribution des assimilats, utilise cette source d'énergie pour transporter le saccharose dans les cellules en même temps qu'il y entraîne un proton. Ce transporteur de haute affinité (K_m autour de 1mM) est capable d'accumuler une grande quantité de saccharose à l'encontre d'un gradient de concentration (Weschke *et al.*, 2000 ; Delrot *et al.*, 2000 ; Coruzzi et Zhou, 2001) (Figure 10, b).

A l'instar du chargement, le déchargement du phloème peut également s'opérer à la fois par les voies symplasmique et apoplasmique. Le phloème ne décharge le saccharose que lorsqu'il a atteint l'extrémité du tube criblé, près de l'organe cible. La voie apoplasmique de déchargement est, elle, régulée par deux enzymes particulières, la sucrose synthase (SuSy) et les invertases.

3.4 Les enzymes de dégradation du saccharose

Le saccharose peut être dégradé par deux types d'enzymes : la sucrose synthase et les invertases.

La sucrose synthase ou SuSy

La sucrose synthase catalyse le transfert d'un résidu glucose (provenant du saccharose) vers une molécule d'UDP, en tirant parti du caractère exergonique de la réaction pour synthétiser de l'UDP-glucose (UDPG) et libérer du fructose (Sebkova *et al.*, 1997) (Figure11). La réaction réalisée par la SuSy peut être réversible dans certaines conditions (variation d'énergie libre = $-3.99 \text{ kJ mol}^{-1}$). Sa forte concentration dans les tissus consommateurs de saccharose sous-entend que sa principale activité est le catabolisme du saccharose (Nolte et Koch, 1993).

Les invertases

Les invertases constituent une classe d'enzymes qui mènent à la dégradation du saccharose en glucose et fructose en catalysant une réaction irréversible (variation d'énergie libre = $-29,3 \text{ kJ / mol}$) (Figure 12). On peut distinguer deux types d'invertases selon leur pH optimal d'activité. Les premières, les invertases "alcalines", sont situées dans le cytoplasme, tandis que les secondes, les invertases "acides", sont présentes à la fois dans la paroi cellulaire et la vacuole (Chengappa *et al.*, 1999).

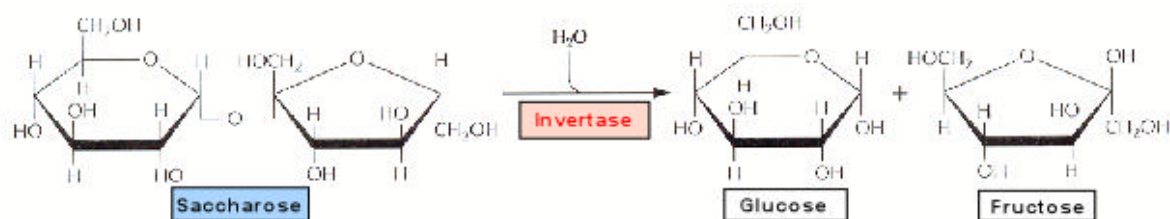


Figure 12: Rôle de l'invertase d'après Buchanan et al., 2000.

Les invertases dégradent le saccharose en glucose et en fructose. Ces deux molécules sont ensuite utilisées dans le métabolisme des cellules différenciées.

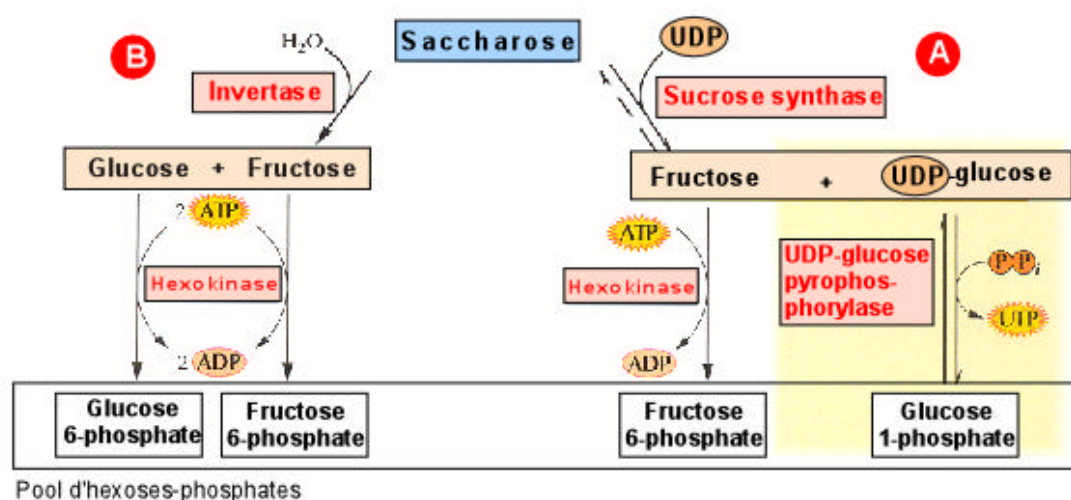


Figure 13 : Différence entre les invertases et le SuSY d'après Buchanan et al., 2000.

La SuSY permet la production de fructose et d'UDP-glucose. L'UDP-glucose riche en énergie réagit avec du pyrophosphate pour former du glucose 1-phosphate sans consommer d'ATP mais en fournissant de l'UTP (A). Les invertases consomment pour leur part deux ATP à chacun des transferts du glucose et du fructose vers le pool d'hexoses phosphates (B).

La SuSy et les invertases se différencient essentiellement par le statut énergétique de leurs produits et par leurs relations avec les hexoses cytosoliques. Bien que l'activité de ces deux types d'enzymes accroisse le pool d'hexoses phosphates (Ruan *et al.*, 1997) (Figure 13), l'utilisation de la sucrose synthase présente l'avantage majeur pour la cellule de conserver l'énergie libre comprise dans la liaison glucose-fructose du saccharose et de l'utiliser directement dans la synthèse de l'UDP-glucose (Nakai *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1999). L'UDP-glucose peut alors réagir avec du pyrophosphate afin de produire du glucose-1-phosphate et de l'UTP, sans utilisation d'ATP (Figure 13, A), au contraire des hexoses libres formés par les invertases, qui ne pourront être phosphorylés que par l'utilisation de deux molécules d'ATP (Figure 13, B). Il n'est donc pas surprenant que la voie de la SuSy soit favorisée dans certaines circonstances, puisqu'elle ne consomme que la moitié de l'énergie utilisée par la voie impliquant une invertase (Black *et al.*, 1987). Ainsi, dans les tissus jeunes formant de nombreuses parois, la sucrose synthase prédomine : elle y fournit l'UDP-glucose précurseur utilisé pour la synthèse des divers polymères pariétaux.

Dans les tissus différenciés, notamment les organes de réserve tels que racines de betterave et de chicorée, l'invertase est majoritaire. Il existe toutefois des exceptions, par exemple : la sucrose synthase est majoritaire dans les tubercules de pomme de terre où près de 70% du saccharose qui s'accumule est transformé en amidon. La présence de SuSy à cet endroit est donc tout à fait logique puisqu'elle fournit l'UDP-glucose qui peut être transformé en amidon plus facilement que les hexoses libérés par l'invertase, et surtout de façon moins coûteuse (Chengappa *et al.*, 1999 ; Zeng *et al.*, 1999).

En résumé, la dégradation du saccharose, catalysée par l'invertase, est généralement considérée comme un fournisseur d'énergie au métabolisme cellulaire (Appeldoorn *et al.*, 2002). L'hydrolyse du saccharose par la sucrose synthase fournit, quant à elle, principalement le substrat (UDP-glucose) nécessaire aux voies de biosynthèse des polysaccharides pariétaux et de réserve (Weber *et al.*, 1996 ; Winter et Huber, 2000). La SuSy, considérée comme une enzyme clé dans le métabolisme des polysaccharides pariétaux (utilisation importante du carbone dans la plante), va donc plus particulièrement retenir notre attention.

4 La sucrose synthase (SuSy)

La sucrose synthase a été mise en évidence pour la première fois par Cardini *et al.*, (1955). Elle a été caractérisée chez de nombreuses espèces végétales telles que le blé (Guerin et Carbonera, 1992), *Arabidopsis* (Martin *et al.*, 1993), le riz (Wang *et al.*, 1999),... et est localisée dans de nombreux organes (racines, cotylédons, feuilles, fruits, graines...). La SuSy est un tétramère composé de quatre sous-unités identiques allant de 80 à 100 kDa. Son activité de dégradation du saccharose déterminée, *in vitro*, est optimale pour des pH compris entre 6.0 et 8.5, ce qui concorde avec sa localisation *in vivo*, principalement cytoplasmique. La SuSy est aussi capable de catalyser la synthèse de saccharose qui est plutôt privilégiée à un pH situé entre 8,5 et 9,5. Les valeurs de Km de la SuSy varient énormément en fonction des espèces ainsi que des isoformes et vont de 10 à 290 mM pour le saccharose et de 0,05 à 6,6 mM pour l'UDP (Sebkova *et al.*, 1995).

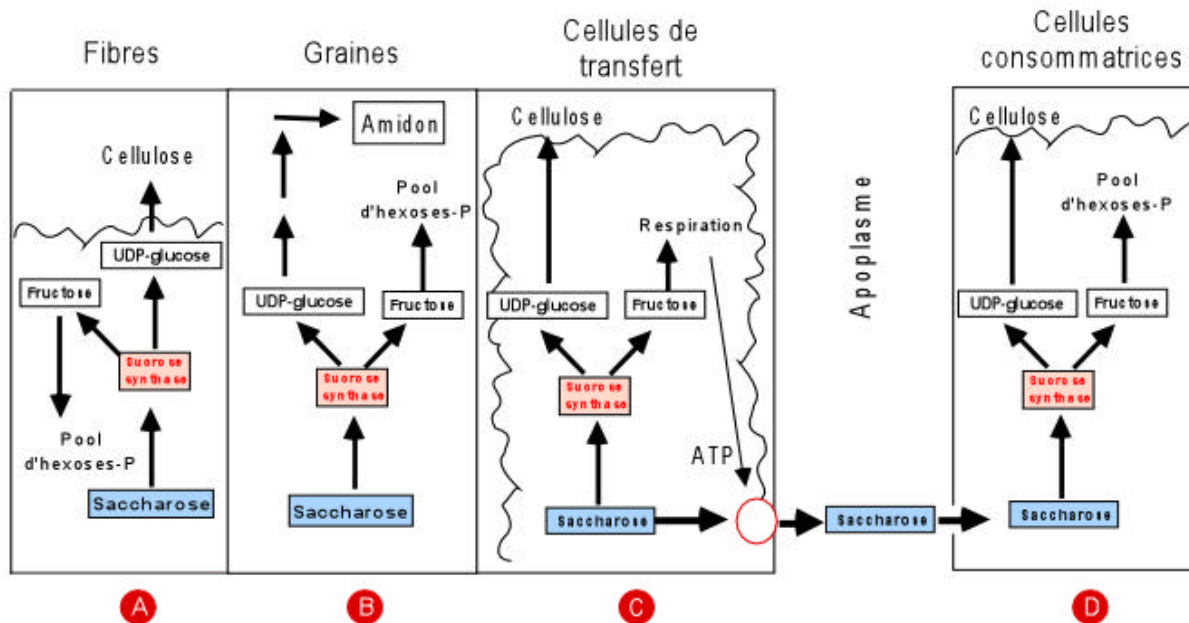


Figure 14 : Les différents rôles de la sucrose synthase d'après Ruan *et al.*, 1997

La SuSy fournit l'UDP-glucose qui est le substrat de la synthèse de cellulose qui forme les fibres de cellulose comme chez le coton (A). Dans certains organes (tubercules de pomme de terre) la SuSy fournit de l'UDP-glucose qui peut servir de substrat à la synthèse d'amidon (B). La SuSy a aussi un rôle dans le chargement (C) et le déchargement du phloème dans les cellules consommatrices (D).

○ : transporteur de saccharose

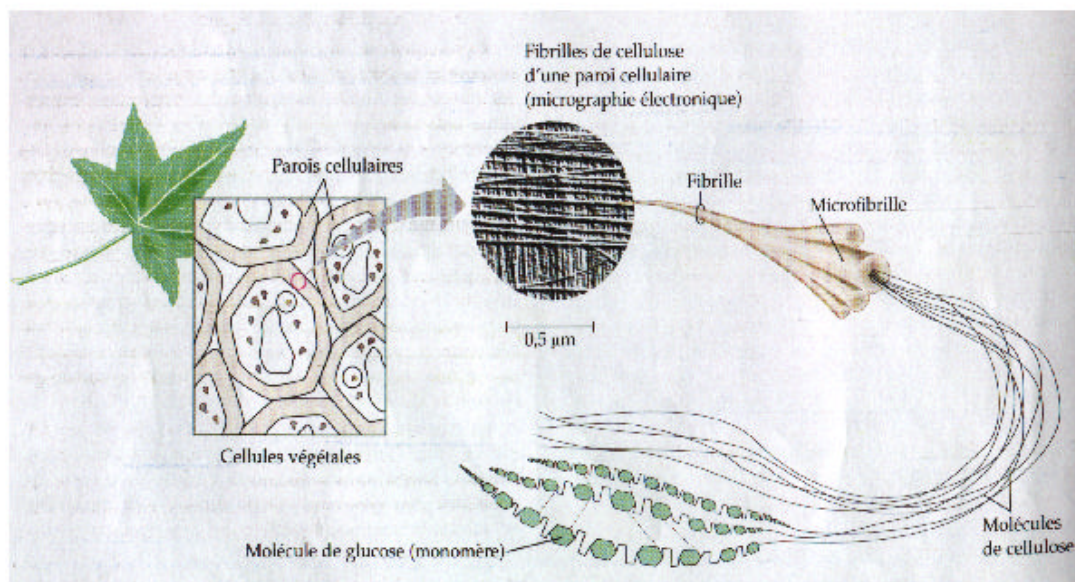


Figure 15: Synthèse de cellulose d'après Campbell 1995

La cellulose est un polymère homogène de résidus glucoses liés en β 1-4 dont plusieurs chaînes peuvent s'associer par ponts hydrogènes pour former des microfibrilles qui peuvent s'assembler ensuite en macrofibrilles qui composent en grande partie les parois des cellules végétales.

La dégradation du saccharose par la SuSy peut être inhibée par l'intermédiaire du fructose et du glucose: le fructose est un inhibiteur non compétitif «pur» pour la SuSy, en d'autres termes, sa fixation à l'enzyme n'empêche pas la fixation du substrat, en l'occurrence le saccharose, et n'est donc pas en compétition avec lui. La présence, en grande quantité, de cet inhibiteur diminue toutefois l'activité de la SuSy. Le glucose est, pour sa part, un inhibiteur non compétitif mixte. Cela signifie que sa liaison à l'enzyme peut modifier la conformation tridimensionnelle de celle-ci empêchant ainsi la fixation du saccharose au site actif et donc l'activation de la SuSy (Sebkova *et al.*, 1995). Des études *in vitro* sur tubercules de pommes de terre ont permis de donner des valeurs de K_i (constante d'inhibition) pour ces deux molécules : elle est de 17,2 mM pour le fructose alors qu'elle est de 4,3 mM pour le glucose. La concentration de ces deux molécules *in vivo* peut donc avoir un rôle régulateur sur l'activité de la SuSy (Sebkova *et al.*, 1995).

Tanase et ses collaborateurs (2002) ont démontré l'existence d'un contrôle de la SuSy de maïs par phosphorylation réversible. Le site de phosphorylation de l'enzyme est un résidu sérine localisé dans le domaine N-terminal de l'enzyme et qui semble similaire entre différentes espèces végétales. Une kinase dépendant du Ca^{2+} (CDPK) a d'ailleurs été proposée pour jouer un rôle clé dans la phosphorylation de la SuSy, ce que nous détaillerons ultérieurement (Asano *et al.*, 2002).

4.1 Rôles de l'enzyme

Comme nous l'avons dit précédemment, la SuSy fournit le substrat (l'UDP-glucose) et l'énergie nécessaire à la synthèse des polysaccharides pariétaux comme la cellulose (Figure 14, A). Elle a aussi un rôle prédominant dans la dégradation du saccharose dans l'endosperme des céréales et dans les tubercules de pommes de terre où elle apporte une partie du substrat pour la synthèse d'amidon (Figure 14, B). Elle intervient également dans la fourniture de substrat pour la respiration mitochondriale qui permet la synthèse d'ATP nécessaire au chargement du phloème (Figure 14, C) ainsi qu'à son déchargement, permettant ainsi l'assimilation du saccharose dans les organes consommateurs (Figure, 14 D).

La sucrose synthase alimente la synthèse des polysaccharides

Les polysaccharides de la paroi qui sont aussi nombreux que divers et complexes, constituent jusqu'à 95% de la paroi des cellules végétales. Parmi ceux-ci, la cellulose est le composé organique le plus synthétisé sur terre - entre 60 et 90 milliards de tonnes par an produites par les végétaux terrestres - (Ruan et Chourey, 1998). La cellulose est un polymère homogène de résidus glucoses liés en 1-4 dont plusieurs chaînes peuvent s'associer par ponts hydrogènes pour former des microfibrilles qui peuvent ensuite s'assembler en macrofibrilles (Figure 15). La cellulose contenue dans les parois primaires des jeunes cellules en division constitue plus de 30% du poids frais de ces dernières. Le profil de dépôt de la cellulose joue donc un rôle capital dans l'expansion des cellules et le contrôle de leur morphogénèse. La plus grosse quantité de cellulose est toutefois déposée dans la

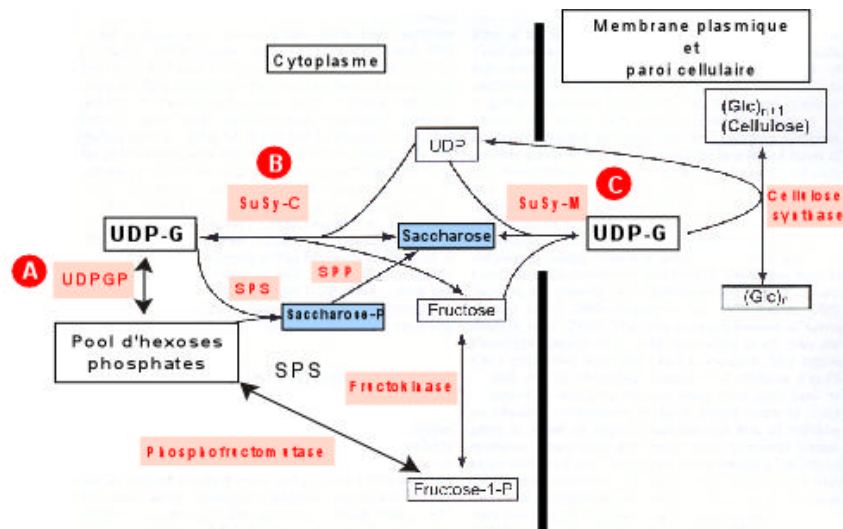


Figure 16 : Modèle de voie de synthèse de cellulose chez les végétaux d'après Delmer et Haigler, 2002.

L'UDP-glucose (UDP-G) peut être formé soit par l'intervention de l'UDP-glucose pyrophosphorylase (UDPGP) (A) soit par l'intervention de la sucrose synthase (SuSy) (B). Deux modèles impliquant la SuSy dans la synthèse de cellulose sembleraient exister. Le premier impliquerait une SuSy cytosolique (SuSy-C) (B) et formerait un pool d'UDP-glucose cytosolique commun avec celui réalisé par l'UDPGP. Le deuxième modèle impliquerait une SuSy associée au niveau de la membrane plasmique (SuSy-M) avec la cellulose synthase (CS) transmembranaire et formerait donc un pool d'UDP-glucose au niveau de la membrane qui serait directement utilisé par la CS pour la synthèse de cellulose (C).

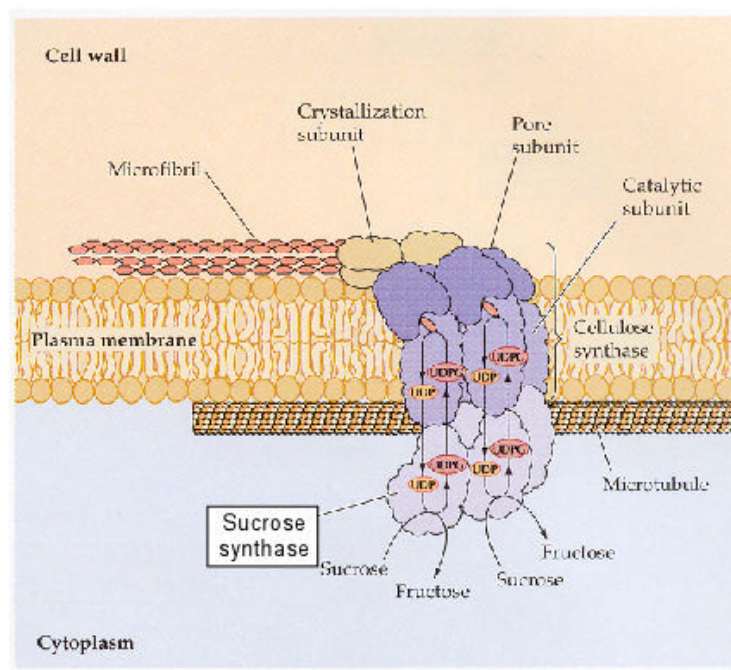


Figure 17 : Association de la sucrose synthase avec la cellulose synthase transmembranaire d'après Buchanan *et al.*, 2000

La SuSy forme un complexe avec la cellulose synthase, l'actine et les microtubules au niveau de la membrane plasmique. A ce niveau la SuSy fournirait directement l'UDP-glucose à la cellulose synthase qui dépose la cellulose directement à la surface de la membrane plasmique.

paroi secondaire des plantes ligneuses (fibre de bois ou éléments vasculaires : xylème et phloème) dont la cellulose représente jusqu'à 50% du poids frais. Il existe toutefois, des exceptions comme les fibres de coton qui sont composées de plus de 90% de cellulose (Delmer et Haigler, 2002).

La synthèse de cellulose chez les végétaux est un processus coordonné qui se déroule à l'interface entre le cytoplasme cortical, la membrane plasmique et la paroi cellulaire (Haigler *et al.*, 2001). La cellulose est synthétisée par la cellulose synthase qui forme un complexe enzymatique associé à la membrane plasmique. Le substrat de cette synthèse, l'UDP-glucose, peut être formé soit à partir d'hexoses phosphates, par l'intervention de l'UDP-glucose pyrophosphorylase (Figure 16, A) soit à partir du saccharose par la sucrose synthase (Figure 16, B).

La SuSy a, dans un premier temps, été identifiée comme une protéine globulaire considérée comme soluble dans le cytosol. Une certaine quantité de SuSy a toutefois été détectée dans la fraction insoluble d'extractions membranaires. Cette fraction est connue pour être enrichie en polymères du cytosquelette tels que les microfilaments et les microtubules. Winter et ses collaborateurs (1998) ont ainsi découvert une grande quantité de SuSy dans la fraction insoluble d'extractions réalisées dans des conditions tendant à stabiliser l'actine-F (filament d'actine). La co-sédimentation de la SuSy avec une fraction du cytosquelette amène à soupçonner son interaction avec un ou plusieurs composants de ce dernier. Des recherches supplémentaires sur les fractions solubles ont permis de découvrir que la forme phosphorylée de SuSy peut interagir avec l'actine-G (actine globulaire). C'est la partie N-terminale de la SuSy qui est impliquée dans la liaison à l'actine. Cette liaison nécessite la phosphorylation de la Ser-15 qui provoque des changements conformationnels, exposant ainsi un site de liaison à l'actine quelque part à la surface de l'enzyme. La liaison de la SuSy à l'actine semble être spécifique, d'autres protéines, comme la BSA, ne réduisant pas la liaison de la SuSy à l'actine, tandis que l'aldolase, connue pour se lier à l'actine, empêche la fixation de la SuSy (Winter *et al.*, 1998).

L'existence de sucrose synthase cytosolique et membranaire a amené à proposer deux modèles de synthèse de la cellulose (Delmer *et al.*, 2000). Dans un premier modèle, la synthèse de la cellulose se produirait par l'intervention d'une cellulose synthase qui utiliserait de l'UDP-glucose cytosolique (provenant de l'activité de la sucrose synthase cytosolique) comme précurseur de la synthèse de la cellulose extracellulaire (Figure 16 B). Dans un second modèle, une forme membranaire de SuSy serait présente en plus de la cytosolique et associée à la cellulose synthase transmembranaire, dirigeant directement, vers la synthèse de la paroi, une quantité importante d'UDP-glucose provenant de la dégradation du saccharose (Figure 16 C). Outre la sucrose synthase, les microtubules et l'actine interagiraient également avec la cellulose synthase membranaire. Le faible niveau de SuSy soluble détecté lors des phénomènes d'élongation cellulaire pourrait s'expliquer par le recrutement de cette dernière au niveau de la membrane plasmique. A cet endroit, elle s'associerait avec les filaments d'actine et la cellulose synthase pour fournir directement l'UDP-glucose nécessaire à la synthèse de la cellulose. Cette

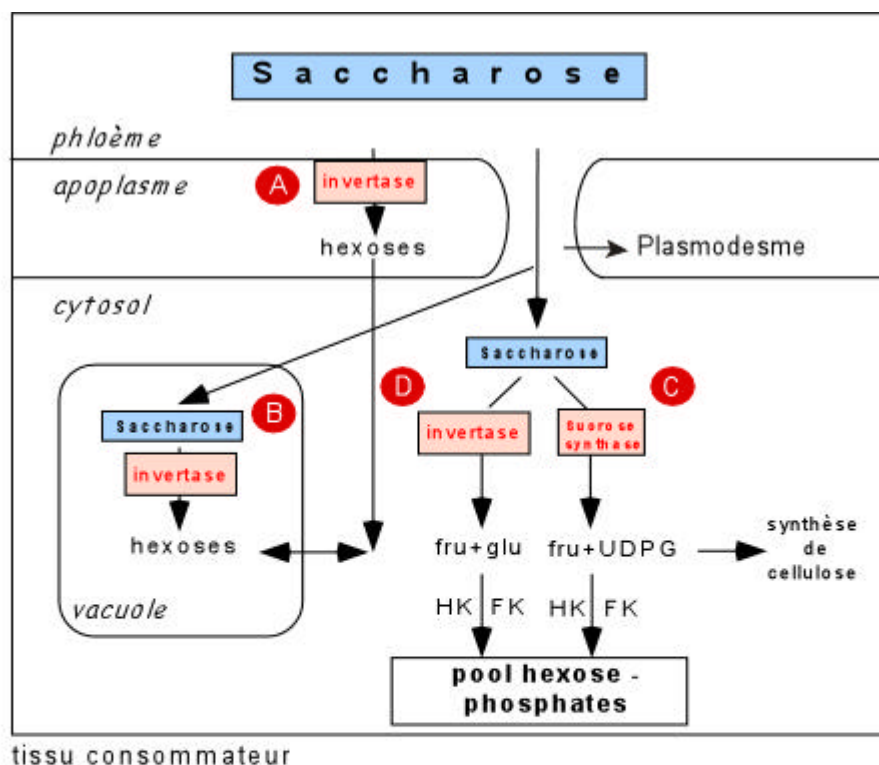


Figure 18: Intervention de la SuSy dans le déchargement du phloème d'après Zrenner *et al.*, 1995.

Le déchargement du phloème peut s'effectuer soit de façon apoplasique via des invertases membranaires (A) soit de façon symplasmique par l'intermédiaire d'invertases vacuolaires (B), de SuSy cytosoliques (C) ou encore d'invertases cytosoliques (D). Les produits de dégradation peuvent alors être utilisés dans le métabolisme des organes consommateurs. (Pour plus de détail voir texte)

dernière serait ensuite apposée à la surface externe de la membrane plasmique pour former la paroi cellulaire (Salnikov *et al.*, 2001) (Figure 17).

Des tests d'immunolocalisation ont par ailleurs confirmé cette association membranaire (Amor *et al.*, 1995). D'autres études sur les fibres de coton ont mis en évidence que plus de la moitié de la SuSy est associée avec la membrane plasmique, ce qui plaide en faveur du modèle impliquant une SuSy directement associée avec le complexe de synthèse de la cellulose. La sucrose synthase fournit donc le premier précurseur de la synthèse de la paroi cellulaire et semble constituer, à côté de la cellulose synthase, la deuxième enzyme clé de la synthèse de cellulose (Shimizu *et al.*, 1997).

La paroi cellulaire contient d'autres polysaccharides, telles les pectines et les hémicelluloses, composées de galactose, d'arabinose, d'acides uroniques, ... Le précurseur de ces polymères est une nouvelle fois l'UDP-glucose. Contrairement à la cellulose, ces polysaccharides sont synthétisés dans l'appareil de Golgi, puis transportés jusqu'à la surface externe de la membrane plasmique par l'intermédiaire de vésicules Golgiennes.

Ajoutons enfin que, dans des organes de stockage tels les graines ou les tubercules en développement, la dégradation du saccharose par la sucrose synthase est souvent associée avec la synthèse d'amidon (Zrenner *et al.*, 1995). Au cours de cette dernière, l'UDP-glucose produit dans le cytosol est converti par une UDP-glucose-pyrophosphorylase en glucose-1-phosphate. Celui-ci est transporté dans les plastes où il sert de précurseur à la synthèse d'ADP-glucose, premier substrat de la synthèse d'amidon (Nakai *et al.*, 1999).

La sucrose synthase et les organes consommateurs

L'efficacité d'absorption des organes consommateurs est définie par la capacité d'utilisation des photoassimilats. Elle dépend principalement du mécanisme de transfert des nutriments à partir du système de transport et de l'utilisation biochimique du saccharose dans les tissus consommateurs (Fu et Park, 1995).

La figure 18 nous montre les différents devenir possibles du saccharose lors du déchargement du phloème dans les tissus cibles. Le saccharose peut être déchargé dans l'apoplasme où une invertase acide apoplasmique peut alors le cliver en glucose et en fructose (A). Ceux-ci peuvent ensuite être transportés dans le cytosol et intervenir dans le métabolisme via le pool d'hexoses phosphate. Le saccharose, également susceptible d'être déchargé par voie symplasmique, peut soit : (1) être transporté dans la vacuole où une invertase acide vacuolaire peut le cliver (B) ; (2) être clivé dans le cytoplasme par la sucrose synthase en UDP-glucose (qui peut soit être utilisé dans la synthèse des polysaccharides, soit rejoindre le pool d'hexoses-P) et en fructose qui peut, lui aussi, rejoindre le pool d'hexoses-P (C) ; (3) être clivé dans le cytoplasme par une invertase pour donner du glucose et du fructose qui peuvent être phosphorylés et rejoindre le pool d'hexoses-P pour être ensuite utilisés dans le métabolisme général (D).

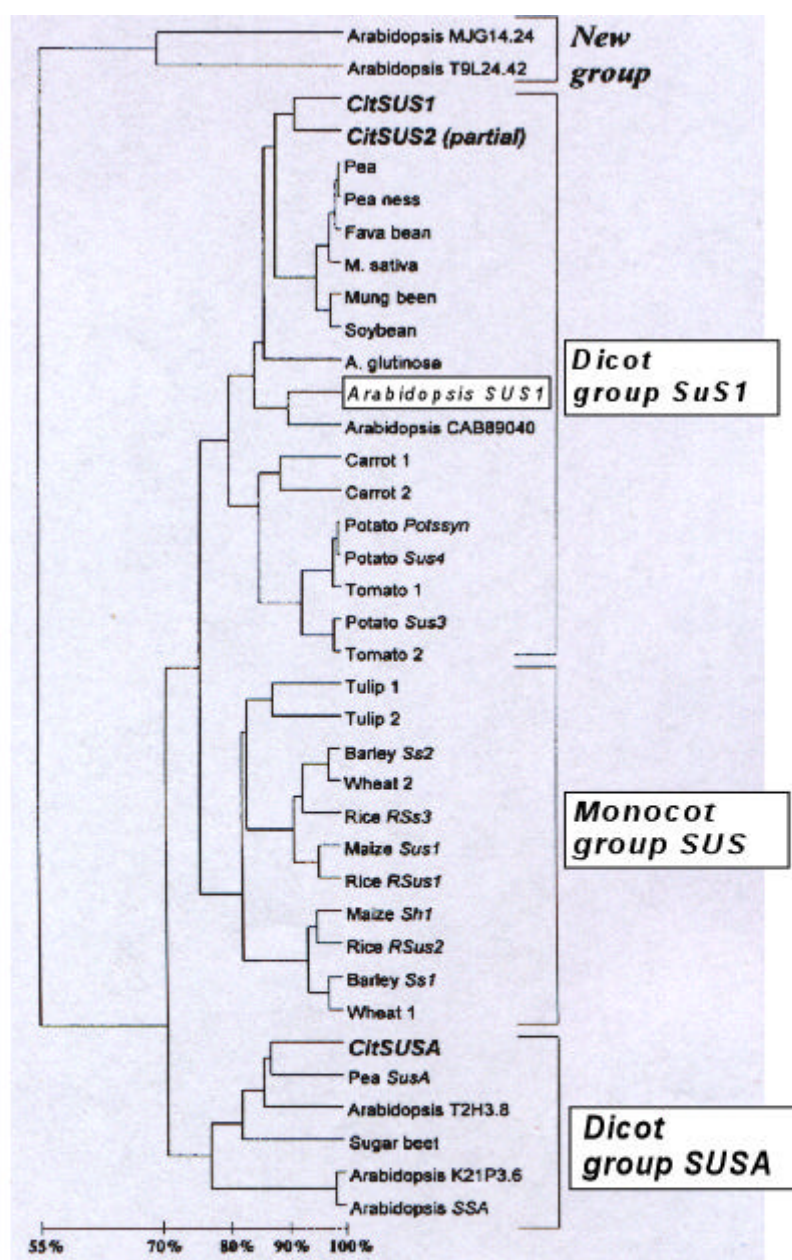


Figure 19 : Dendrogramme des différentes isoformes de SuSy d'après Komatsu *et al.*, 2002

Les SuSy sont classées en trois groupes majeurs : un groupe représenté chez les monocotylédones (groupe SUS) et deux groupes majeurs chez les dicotylédones (groupe SuS1 et SuSA) En italique, nous retrouvons la forme de SuSy d'*Arabidopsis* qui, au laboratoire, a servi à la production d'anticorps.

Une étude récente combinant microscopie confocale et analyses biochimiques a démontré que le déchargement du phloème dans un organe modèle comme les tubercules de pommes de terre, se produit principalement par voie apoplastique (intervention d'invertase pariétale) dans les premiers jours de développement avec ensuite une augmentation de l'activité de la sucrose synthase. Cette augmentation provoque une modification du déchargement qui devient plutôt symplasmique dans les derniers jours où l'on constate aussi une plus grande activité de l'invertase cytosolique (Viola *et al.*, 2001).

C'est en raison de son intervention dans le déchargement du phloème et dans le développement des organes consommateurs que la SuSy a été désignée comme marqueur de l'efficacité assimilatrice de ces organes. Dans les organes consommateurs à croissance rapide, la sucrose synthase est la principale enzyme de dégradation du saccharose (Sun *et al.*, 1997). Il est clair qu'une concentration élevée en enzymes de dégradation du saccharose augmente la capacité d'assimilation des organes consommateurs et en facilite le développement. En effet, une forte activité assimilatrice abaisse la concentration en saccharose présent dans les organes consommateurs: le gradient ainsi généré permet de maintenir un déchargement du phloème efficace et nécessaire au développement de ces organes (Chengappa *et al.*, 1999).

En règle générale, l'activité de la sucrose synthase est très importante dans les premiers stades de développement, ainsi qu'au stade mature lorsque reprend l'accumulation du saccharose. L'activité de la sucrose synthase semble donc liée à l'importation du saccharose et à sa consommation par des organes "consommateurs" (Hanggi et Flemming, 2001). Pour terminer, une augmentation d'activité de la SuSy a été décrite en réponse à l'anaérobiose (phénomène présent à l'extrémité des racines ou lors d'inondations), à un stress au froid ou à la lumière. Ces conditions qui requièrent une meilleure assimilation du saccharose soulignent bien l'importance de la SuSy dans le développement des organes consommateurs dans des conditions limitantes (Rouhier et Usada, 2001).

4.2. Les isoenzymes

Les progrès rapides de la biologie moléculaire ont permis l'isolement et le séquençage d'isoformes de sucrose synthase chez de nombreuses espèces dont *Arabidopsis* (Martin *et al.*, 1993), le maïs (Koch *et al.*, 1992), la carotte (Sturm, 1996), le riz (Wang *et al.*, 1999),.... La comparaison de ces données a permis de classer les sucrose synthases en trois groupes majeurs (Figure 19): un groupe représenté chez les monocotylédones (groupe SUS) et deux groupes présents chez les dicotylédones (groupe SUS1 et le groupe SUS2) (Komatsu *et al.*, 2002).

Chez les monocotylédones comme le maïs, les sucroses synthases sont encodées par deux gènes différemment exprimés, *sh1* (Shrunken aussi appelé *sus2*) et *sus1* (Sturm *et al.*, 1999). La production de SH1 est limitée à l'endosperme (tissu de réserve des graines), alors que celle de SUS1 a été mise en évidence dans divers tissus tels les racines, les tiges, mais aussi l'endosperme (Chen et Chourey, 1989). L'existence de ces deux

isoenzymes a aussi été détectée chez le froment (Marana *et al.*, 1990) et le blé (Guerin et Carbonero, 1997).

Chez les dicotylédones, le groupe SUS1 englobe une série d'isoformes telles que les deux gènes *sus₃* et *sus₄* d'*Arabidopsis* et de pomme de terre. Les gènes *sus₃* et *sus₄* de pommes de terre ont une structure identique aux deux gènes (*sh1* et *sus1*) observés chez les céréales, et les protéines produites y jouent un rôle similaire. A l'instar de SH1 chez les monocotylédones, SUS4 est produite exclusivement dans les racines où elle joue un rôle dans le déchargement du phloème. A l'inverse de SUS3 qui est produite tant dans les feuilles que les tiges et les racines (Fu et Park, 1995). Trois isoformes de la SuSy ont également été découvertes chez le pois (SUS1, SUS2, SUS3). Les gènes codant pour ces protéines possèdent des profils d'expression distincts dans les différents organes de la plante, ainsi que durant son développement (Barratt *et al.*, 2001). Le groupe SUSA rassemble quant à lui des séquences distinctes de SS d'*Arabidopsis*, de betterave et de pois (Komatsu *et al.*, 2002).

Le gène de la sucrose synthase *asus₁*, isolé à partir d'une banque génomique d'*Arabidopsis*, présente des homologies de 67 à 72% avec des gènes de SuSy de pommes de terre, de maïs ou encore d'*Arabidopsis*. Une comparaison du gène *asus1* et du gène *sh1* montre que la localisation des introns et des exons est totalement conservée entre *Arabidopsis* et le maïs (Martin *et al.*, 1993).

Une étude de mutation du gène *sus1* du radis a par ailleurs révélé une diminution de 30% de la synthèse d'amidon dans les racines sans que le contenu en cellulose en soit affecté. Ceci indique que l'isoforme SUS1 est moins importante pour la synthèse de cellulose. Ce résultat démontre que différentes isoformes de SuSy peuvent diriger le saccharose préférentiellement vers une voie de synthèse plutôt qu'une autre.

A l'heure actuelle, la recherche d'isoformes fait encore l'objet de nombreux débats. L'existence d'une forme membranaire de la SuSy en plus de la forme cytosolique est cependant certaine. D'un côté, la littérature démontre que ce sont les conditions cellulaires qui déterminent le caractère membranaire ou cytosolique de la SuSy : ce phénomène serait contrôlé par la phosphorylation de l'enzyme. D'un autre côté, des études de mutants pour les gènes *sh1* et *sus1* du maïs indiquent que différentes isoformes peuvent avoir des rôles différents. En effet, si les mutations des deux gènes affectent la synthèse d'amidon dans l'endosperme, seule la mutation de *sh1* provoque une dégénérescence phénotypique. L'isoforme SH1 est donc plus importante que SUS1 pour la fourniture du carbone à la voie de synthèse de la cellulose (Barratt *et al.*, 2001).

4.3. Modulation de l'expression de la sucrose synthase

Contrôles transcriptionnels

Le métabolisme du saccharose est impliqué notamment dans la synthèse des polysaccharides et la transduction du signal. Une perturbation de l'expression des gènes codant pour la SuSy peut donc, non seulement perturber l'entrée du carbone dans différentes voies de synthèse, mais aussi engendrer des modifications dans

l'expression de certains gènes du métabolisme général par la voie du "sugar sensing".

L'expression des gènes codant pour la SuSy peut être influencée non seulement par le niveau de saccharose présent dans le milieu cellulaire, mais aussi et indirectement, par la durée de la photopériode. Ainsi chez le maïs, l'ARNm de *sh1* est fortement exprimé sous des conditions limitantes en saccharose (~ 0.2%). On en retrouve aussi à l'intérieur des jeunes feuilles au moment où ces dernières ne sont pas encore capables de synthétiser leur propre saccharose. Le niveau de transcrite de *sus1*, lui, est quasi inexistant dans ces conditions mais augmente d'un facteur dix, voire plus, lorsque la concentration en glucose atteint 20%. Par ailleurs, entre le début et la fin de la période de clarté, le niveau de transcrite de la SuSy double, prouvant ainsi l'influence indirecte de la photopériode sur certains gènes (via la quantité de sucres) (Geigenberger et Stitt, 2000).

Lorsqu'un végétal est en présence d'une faible concentration d'O₂ (durant une période de 12 heures à 7 jours), l'expression de la SuSy augmente, alors que celle de l'invertase diminue fortement. Au moins deux raisons expliquent ce résultat. Premièrement, la SuSy rend possible une mise en réserve immédiate de saccharose, de carbone et d'ATP, ce qui est un atout majeur sous une faible quantité d'O₂, qui est encore renforcé par la répression de l'invertase. La diminution d'expression des invertases est remplacée par une expression de la SuSy qui permet de réduire la dépense en énergie et d'alimenter la synthèse d'amidon de réserve (Black *et al.*, 1987; Nakai *et al.*, 1999). Ce type de réaction est très rapide. En effet, une étude sur les produits de dégradation des enzymes a montré que deux heures après avoir subi un stress anaérobique (racines de maïs), la quantité de substrats fournis aux réactions importantes comme la respiration atteint le niveau minimum nécessaire au bon fonctionnement de ce cycle. La quantité de sucres se maintient donc à un niveau suffisant pour gérer la période post-stress et relancer ainsi l'intégralité du métabolisme (Zeng *et al.*, 1999).

Deuxièmement, la réduction de l'expression et de l'activité de l'invertase peut avoir des répercussions plus importantes que celle de la SuSy, en limitant la quantité de glucose et de fructose produite et donc l'effet que de ces derniers pourraient avoir sur la transduction du signal. Ces sucres pourraient ainsi jouer le rôle de molécules signal et relancer l'expression de certains gènes favorisant une utilisation massive du saccharose et du carbone, au lieu de le conserver exclusivement pour assurer un fonctionnement minimum du métabolisme. L'étendue de ces signaux dépend du type de clivage du saccharose : en effet, l'invertase fournit deux fois plus d'hexoses non phosphorylés que la SuSy (Koch *et al.*, 1992). Puisque ces molécules sont à la base d'une voie de transduction du signal chez les plantes, il est normal que l'expression et donc l'action de l'invertase, qui a un impact plus important sur le sugar sensing que la SuSy, soit réprimée pour éviter une action sur l'expression de gènes sensibles au fructose et au glucose. Le passage à l'utilisation presque exclusive de la SuSy lors de stress anaérobiques est donc un moyen efficace et rapide pour un végétal d'empêcher une déperdition d'énergie dans des réactions non vitales, et de favoriser sa survie en cas d'inondation par exemple.

L'oxygène a donc un rôle régulateur sur l'expression des gènes de la SuSy. Contrairement à *sus1*, le gène *shrunk* de maïs est fortement induit sous des conditions d'anaérobiose comme en cas d'inondation. Durant

une telle phase d'anaérobiose, des taux accrus d'ARNm de la sucrose synthase entraînent une augmentation de la teneur de cette enzyme dans les racines (Komatsu *et al.*, 2002).

L'expression de la SuSy dépend ainsi de facteurs endogènes et environnementaux. La multiplicité des réponses des gènes codant pour la SuSy fournit un mécanisme permettant d'altérer le profil de distribution des enzymes en réponse aux changements en hydrates de carbone, et d'ajuster le métabolisme du saccharose des cellules consommatrices à la quantité des photoassimilats disponible (Baratt *et al.*, 2001).

Malgré leur homologie de séquence, les gènes codant pour la SuSy sont souvent régulés différemment, très vraisemblablement grâce aux nombreux éléments *cis* que comportent leurs promoteurs. Sur base de la régulation de leur expression, les gènes de la SuSy peuvent être classés en deux groupes : le premier est composé des gènes de SuSy qui sont constitutivement exprimés, comme le gène *sus1* du maïs, le deuxième comprend les gènes dont l'expression est fortement régulée par les différents facteurs environnementaux, comme le gène *sh1* du maïs, dont l'expression est régulée en condition d'anaérobiose ou encore par les quantités de saccharose présentes dans le milieu (Martin *et al.*, 1993).

Contrôle post-traductionnel

Un mécanisme majeur de contrôle de la SuSy au niveau protéique, impliquant un phénomène de phosphorylation, vient encore d'être mis en évidence récemment. Tanase et Yamaki (2000) ont ainsi découvert l'existence de deux isoformes de la SuSy chez la poire japonaise : SSI et SSII. Ils se sont alors rendu compte que les isoenzymes SSI et SSII correspondaient respectivement à la forme phosphorylée et non phosphorylée de la SuSy. La forme phosphorylée a plus d'affinité pour l'UDP et fonctionne donc plus dans la direction de dégradation du saccharose. Cette affinité de la SuSy phosphorylée pour l'UDP a aussi été observée chez la tomate, le soja et le maïs. La forme non-phosphorylée a, quant à elle, une plus grande affinité pour l'UDP-glucose et favorise la synthèse du saccharose. La SSI a été détectée uniquement dans les jeunes fruits : le saccharose, après clivage par la forme phosphorylée, y est en fait principalement utilisé comme substrat de la synthèse des polysaccharides pariétaux. La SSII a plus particulièrement été mise en évidence dans les fruits matures : cette forme non-phosphorylée de la SuSy est utilisée pour la synthèse de saccharose qui s'accumule dans le fruit et lui donne sa saveur (Tanase *et al.*, 2002).

4.4. La localisation de la sucrose synthase

La détection d'une grande quantité de SuSy dans les fibres de coton et dans le xylème durant le dépôt de la paroi secondaire confirme bien son rôle dans la synthèse des polysaccharides pariétaux (Delmer et Haigler, 2002). La SuSy a également été détectée en association particulière avec les tissus vasculaires des grains de riz. Plus spécifiquement, elle a été détectée dans les cellules compagnes de feuilles de maïs et dans le citron. La protéine est toutefois plus généralement observée dans les tissus consommateurs comme les racines de maïs et les tubercules de pommes de terre (Tanase *et al.*, 2002).

De nombreuses études utilisant des techniques comme le Western blot et l'immunodétection ont été mises en œuvre afin de mettre en évidence la sucrose synthase. Durant la croissance des hypocotyles de radis, la SuSy a été localisée dans les cellules compagnes du phloème confirmant l'idée de Nolte et Koch (1993) qui spécifiait que la dégradation du saccharose par la SuSy se déroulait bien dans ces cellules et que les produits d'hydrolyse étaient bien utilisés pour le développement des organes consommateurs (Wang *et al.*, 1999; Rouhier et Usada, 2001; Komatsu *et al.*, 2002).

La SuSy a également été localisée dans le cytoplasme des cellules de tissus de stockage comme l'endosperme, confirmant son rôle dans l'apport indirect du substrat de synthèse de l'amidon (Wittich et Vreugdenhil, 1998), ainsi que dans les feuilles de pommes de terre (Fu et Park, 1995) et les fruits du citronnier (Nolte et Koch, 1993).

En résumé, la SuSy joue donc un rôle clé dans le métabolisme du saccharose. Nous allons présenter dans ce qui suit l'autre enzyme concernée par notre travail : l'ADP-glucose pyrophosphorylase, principale enzyme contrôlant la synthèse d'amidon et du métabolisme duquel nous allons passer en revue les principaux axes.

5. Le métabolisme de l'amidon

5.1 L'amidon, l'amylose et l'amylopectine

L'amidon est un polymère de glucoses liés en α -1,4 qui est synthétisé dans les plastes. Eu égard à son degré élevé de polymérisation, l'amidon ne peut être transporté, il est donc stocké temporairement dans les chloroplastes (amidon transitoire) et à plus long terme dans les amyloplastides des tissus de réserve (amidon de réserve). L'amidon peut représenter jusqu'à 70% du poids frais des graines amylacées et 30% des organes de réserve. Il s'y présente sous forme de grains, de 0.1 à 10 μ m de diamètre, dispersés dans les plastes et sans pouvoir osmotique : la synthèse d'amidon permet le stockage en masse de carbone réduit sans risque d'éclatement osmotique (Guignard, 2000). L'amidon transitoire sert principalement de réserve de carbone qui est directement utilisée durant les nuits afin de subvenir aux demandes de la plante durant cette période de non-activité de la photosynthèse. L'amidon de réserve constitue, pour sa part, un stock durable de réserve de carbone utilisé le plus souvent en période de stress (froid, inondation) pour permettre la survie du végétal dans ces conditions défavorables (Buchanan *et al.*, 2000).

L'amidon est constitué de 20 à 30% d'amylose (0,1-1 kDa) essentiellement linéaire, le reste étant de l'amylopectine ramifiée (10 à 100 kDa). L'amylopectine se trouve dans un état semi-cristallin, et est phosphorylée en C3 ou C6 des glucoses. Cette phosphorylation a surtout lieu dans l'amidon de tubercules, et surtout de la pomme de terre. Toutefois, à la différence de l'amidon transitoire stocké dans les chloroplastes et constitué

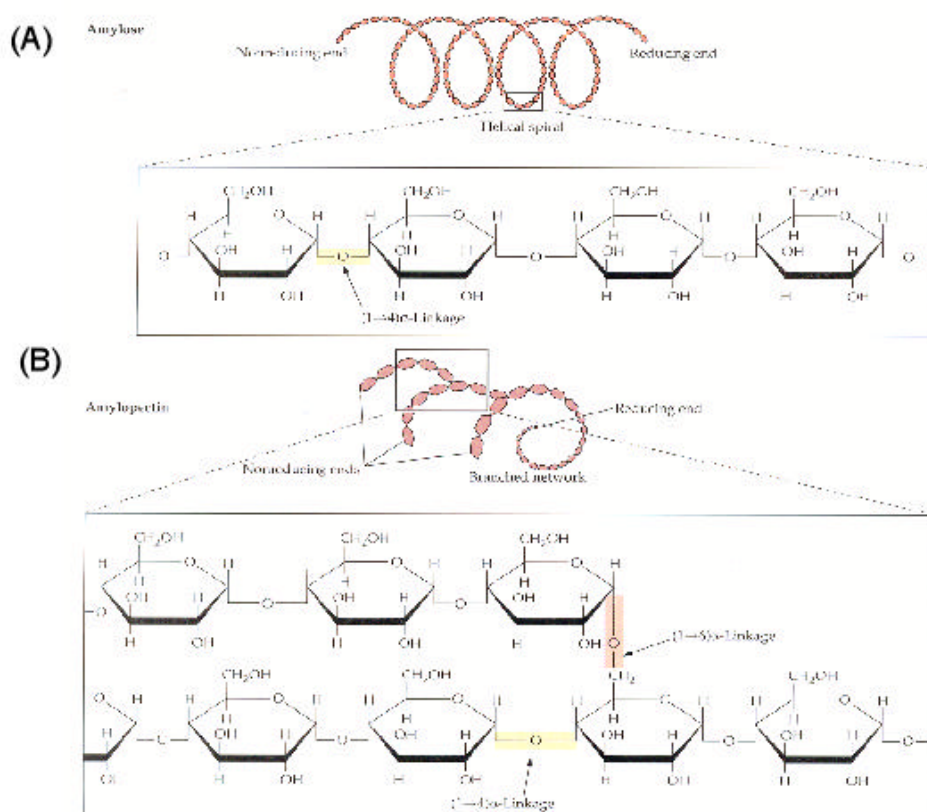


Figure 20 : L'amylose et l'amylopectine d'après Buchanan *et al.*, 2000

(A) L'amylose est une longue chaîne composée de molécules de glucoses liées en α 1-4 et non ramifiées. L'amylopectine (B) comprend de nombreuses chaînes latérales asymétriques liées en α 1-6.

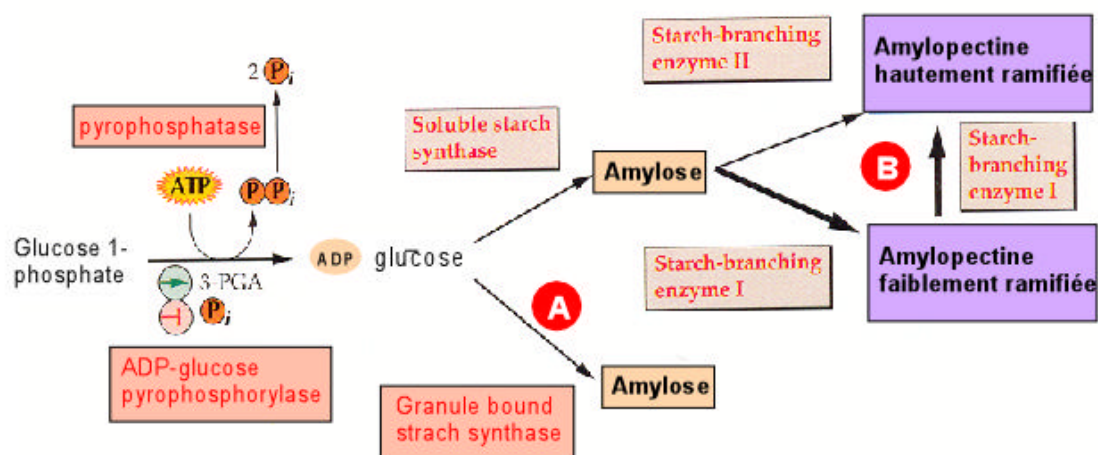


Figure 21 : Synthèse d'amylose et d'amylopectine d'après Buchanan *et al.*, 2000

L'élongation de l'amylose à partir de molécules d'ADP-glucose fait intervenir au moins quatre isoformes d'amidon synthase dont la plus importante est la Granule Bond Starch Synthase (A). Les ramifications de l'amylopectine sont, pour leurs part, dues à deux enzymes ramifiantes (B).

uniquement d'amylopectine, l'amidon de réserve des amyloplastest est constitué d'un mélange d'amylose et d'amylopectine (Zeeman *et al.*, 2002).

a) *L'amylose*

Longue chaîne, peu ramifiée (moins de 1% de ramifications), comprenant 600 à 6000 monomères de glucose. La position en α de la liaison osidique impose une rotation entre les plans de deux monomères consécutifs, ce qui conduit à la forme hélicoïdale de la macromolécule (Figure 20 A). L'élongation de l'amylose avec transfert de glucose à partir d'ADP-glucose fait intervenir au moins quatre isoformes d'amidon synthases. Parmi celles-ci, la GBSS (Granule-Bound Starch Synthase), dont le gène muté entraîne l'absence d'amylose, est tout à fait cruciale (Figure 21 A).

b) *L'amylopectine :*

Constituée de 6000 à 600 000 unités de glucose, l'amylopectine comporte de nombreuses chaînes latérales (plus de 6% de ramification) asymétriques. La ramification de l'amylopectine résulte de l'action d'enzymes « branchantes ». La réaction consiste à transférer des segments de 8 à 17 monomères de glucose provenant d'une chaîne non encore ramifiée (Figure 20 B). Les ramifications de l'amylopectine sont dues à deux isozymes (enzymes ramifiantes A et B). Seul le rôle exact de l'enzyme A est connu. Il est vraisemblable que des enzymes déramifiantes interviennent également dans la synthèse de l'amylopectine (Figure 21, B).

Le rapport amylose / amylopectine varie de 1/8 à 1/3, non seulement en fonction de l'espèce, mais également selon le tissu considéré à l'intérieur d'une même plante. Ce rapport est d'une importance capitale pour l'industrie alimentaire, car il détermine le mode de cuisson des productions alimentaires, ainsi que le type d'utilisation qui peut être faite de l'amidon. Une bonne partie du maïs produit dans les pays industrialisés est utilisée en amidonnerie. Les produits issus de cette industrie sont nombreux, l'alimentation humaine et la papeterie / cartonnerie étant les plus importants (respectivement plus de 50% et 25% de l'amidon de maïs produit). L'utilisation de mutants de maïs permet de modifier à la fois le rapport amylose / amylopectine, ainsi que la qualité de chacun des polymères de base. Le mutant le plus utilisé, appelé "WAXY", ne contient ainsi que de l'amylopectine, c'est-à-dire un amidon très branché doté de bonnes caractéristiques de viscosité. Il est utilisé comme stabilisant et épaississant en alimentation humaine ou comme adhésif et agent lissant en cartonnerie/papeterie. Ces hybrides présentent des rendements inférieurs aux variétés non-mutantes. L'obtention du caractère WAXY par transgénèse permet toutefois de disposer d'un caractère dominant et d'éliminer les pénalités de rendement entraînées par la mutation (www.agriculture.gouv.fr).

5.2. La synthèse d'amidon

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction générale (Figure 2 ; la nuit) au sein des chloroplastes, le cycle de Calvin fournit les précurseurs de la synthèse d'amidon lorsque la synthèse de saccharose excède sa consommation. Les trioses phosphates qui sont alors accumulés dans le chloroplaste sont transformés en glucose 6-phosphate puis en glucose 1-phosphate, substrat de l'AGPase pour la synthèse d'ADP-glucose, premier substrat de la synthèse d'amidon transitoire (Figure 22 A).

La synthèse de l'amidon de réserve est, pour sa part, un processus plus lent, s'étendant sur plusieurs semaines

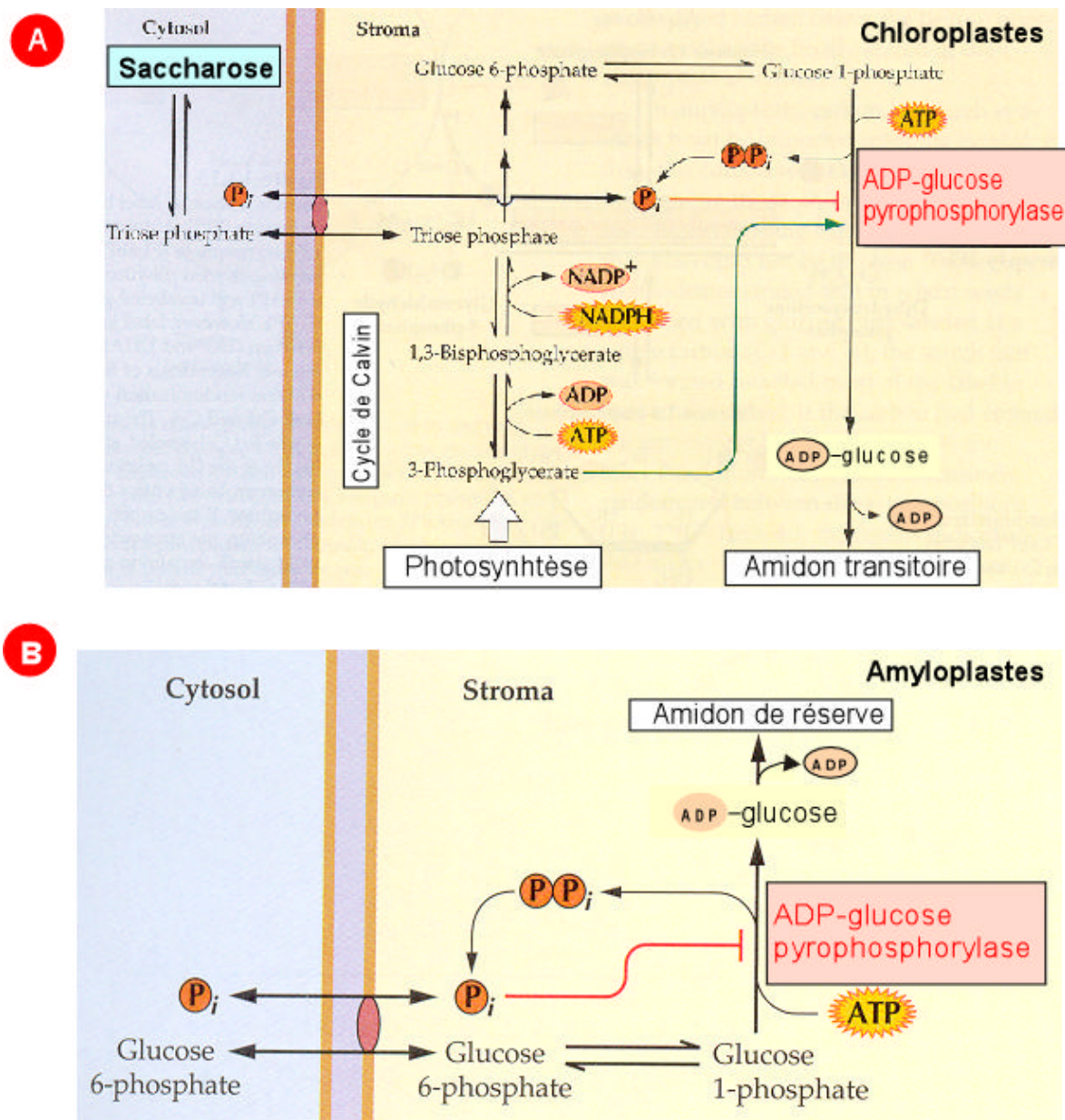


Figure 22 : Synthèse d'amidon dans les chloroplastes et autres plastes d'après Buchanan et al., 2000.

L'ADP-glucose pyrophosphorylase catalyse la première étape de synthèse de l'amidon aussi bien dans les chloroplastes (A) que dans les autres plastes (Amyloplastes) (B). Elle fournit en fait l'ADP-glucose nécessaire à la synthèse d'amylose et d'amylopectine. Pour plus de détail de la voie de synthèse, voir Figure 21.

et dont le saccharose est la source de carbone réduit. Dans les amyloplast (non photosynthétisants), le carbone nécessaire à la synthèse d'amidon est importé du cytosol où le saccharose est converti en glucose-6-phosphate. Après transport dans l'amyloplaste, le glucose-6-phosphate est isomérisé en glucose-1-phosphate avant d'aboutir à la synthèse d'ADP-glucose grâce à une enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) (Figure 22 B).

Cette enzyme est donc la clé du processus de synthèse d'amidon, elle fournit le précurseur (ADP-glucose) aux amidon synthases responsables de la polymérisation de l'ADP-Glucose en amylose et amylopectine (Guignard, 2000 ; Buchanan *et al.*, 2000)

6. L'ADP-glucose-pyrophosphorylase ou AGPase

L'AGPase, mise en évidence pour la première fois par Espada en 1962, a été par la suite détectée dans de nombreuses espèces de végétaux comme le pois, le riz (Hylton et Smith, 1992), le blé (Villand *et al.*, 1992), *Arabidopsis* (Villand *et al.*, 1993),...

Elle forme un hétéro-tétramère composé de deux types de sous-unités distinctes mais néanmoins structurellement assez proches, la petite et la grande sous-unité (Krishnan *et al.*, 1986 ; Chen *et al.*, 1998). La première est généralement désignée par la lettre S pour « small » et présente un poids moléculaire compris entre 47 et 51 kD. L'autre dite « large », symbolisée par un L, se situe dans une gamme allant de 49 à 60 kD. Toutes deux s'assemblent en un tétramère (2L+2S) de 200 à 240 kD qui constitue la forme active de l'enzyme (Villand *et al.*, 1993 ; Salamone *et al.*, 2002).

L'AGPase est une enzyme allostérique activée par la présence de 3-Phosphoglycérate (3-PGA), mais inhibée par le phosphate inorganique (Pi). Le rapport entre la quantité de 3-PGA et de Pi détermine donc le taux d'activité de l'enzyme en régulant son fonctionnement et donc indirectement la quantité d'amidon présent dans les plastes (Kleczkowski, 2000). Ce type de régulation a été observé à la fois dans les organes photosynthétisants et non-photosynthétisants. Toutefois ce type de contrôle ne semble pas être généralisé puisque les AGPases d'endosperme de blé, d'orge et de quelques lignées de maïs sont insensibles au rapport 3-PGA / Pi, démontrant une certaine hétérogénéité dans la régulation de l'AGPase (Singh *et al.*, 2002).

Une étude de la structure d'une AGPase recombinante de tubercules de pommes de terre, a permis de comprendre les interactions entre les sous-unités et le rôle joué par chacune d'elles à l'intérieur de l'enzyme hétéro-tétramérique des plantes supérieures (Preiss, 1997b). En absence de la grande sous-unité, les petites sous-unités sont capables de se rassembler en une structure quaternaire homotétramérique. L'homotétramère ainsi formé a toutefois des propriétés allostériques particulières. En effet, même si cette enzyme possède une activité AGPase (fortement réduite), elle est moins sensible à l'activation au 3-PGA, tout en étant plus sensible à l'inhibition par le Pi que la forme hétérotétramérique (Greene et Hannah, 1998). En l'absence de la petite sous-unité, les grandes sous-unités sont incapables de former une structure stable. Il a donc été proposé que l'assemblage de l'hétérotétramère de l'AGPase soit initié par la formation d'un homodimère de petites sous-unités. Cet homodimère peut ensuite interagir avec des grandes ou des petites sous-unités : par exemple, en

l'absence de grande sous-unité, l'homodimère peut interagir avec des petites sous-unités et former un homotétramère (Wang *et al.*, 1998). En comparant l'AGPase de la pomme de terre sous sa forme active et non active sur un gel SDS en conditions non réductrices, Fu et ses collaborateurs (1998) ont mis en évidence une réduction de ponts disulfures entre les Cys12 de deux petites sous-unités, lors des premières étapes du processus d'activation de l'enzyme (Fu *et al.*, 1998).

Des études de délétion des extrémités N et C terminales des deux sous-unités ont permis d'éclaircir leurs rôles respectifs. On a ainsi pu observer que la suppression de la partie carboxy-terminale des deux sous-unités ne permet pas la formation de l'AGPase. Ce résultat indique que cette extrémité est importante pour le repliement de chacune des sous-unités et/ou de l'assemblage de l'enzyme. La suppression des 10 acides aminés de la partie N-terminale de la petite sous-unité produit une enzyme fonctionnelle mais accroît la résistance de l'enzyme à l'inhibiteur. La même délétion au niveau de la grande sous-unité accroît aussi la résistance de l'enzyme à l'inhibiteur tout en augmentant la sensibilité au 3-PGA (Laughlin *et al.*, 1998).

Certains résidus lysines (Lys) interviennent dans la régulation de l'AGPase de feuilles d'épinards et sont fortement conservés dans la séquence de l'enzyme hétérotétramérique d'un grand nombre d'espèces comme la pommes de terre, le maïs, l'orge... En effet, la mutation des Lys-404 et Lys-441 des petites sous-unités en alanine réduit l'affinité de l'enzyme à la fois au 3-PGA et au Pi. Quand les Lysines équivalentes sont mutées sur la grande sous-unité, l'inhibition n'est pas altérée alors que la sensibilité à l'activateur ne diminue que faiblement. Ces données démontrent que les résidus Lysine (Lys-404 et Lys-441) de la petite sous-unité sont plus importants pour la régulation de l'AGPase que leurs homologues des grandes sous-unités. La petite sous-unité regroupe l'ensemble des activités catalytiques de l'enzyme. En effet, la grande sous-unité exprimée seule ne manifeste aucune activité AGPase. Le rôle de cette sous-unité serait donc principalement d'interagir avec la petite sous-unité et de modifier la conformation de l'enzyme afin de rendre l'AGPase fonctionnelle. (Ballicora *et al.*, 1998). La combinaison de ces résultats prouve bien que les extrémités N et C-terminales sont essentielles au maintien des propriétés catalytiques et allostériques de l'AGPase.

6.1. Rôle de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

Comme déjà signalé précédemment, l'AGPase catalyse la première étape de la synthèse d'amidon et joue de ce fait un rôle régulateur majeur dans ce processus aussi bien dans les tissus photosynthétisants que dans les autres (Doan *et al.*, 1999). A titre d'exemple, des mutations et des inhibitions antisens de l'AGPase ont conduit à une forte diminution de la production d'amidon : les mutants brittle-2 (*bt-2*) et Shrunk-2 (*Sh-2*) de maïs dont les mutations touchent respectivement les gènes de la petite et de la grande sous-unité de l'AGPase ne contiennent qu'une quantité réduite d'amidon (Denyer *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 2002 ; Rolletscek *et al.*, 2002). De même, on a constaté une absence d'amidon chez le mutant *adg1-1* qui ne manifeste aucune activité AGPase (Wang *et al.*,

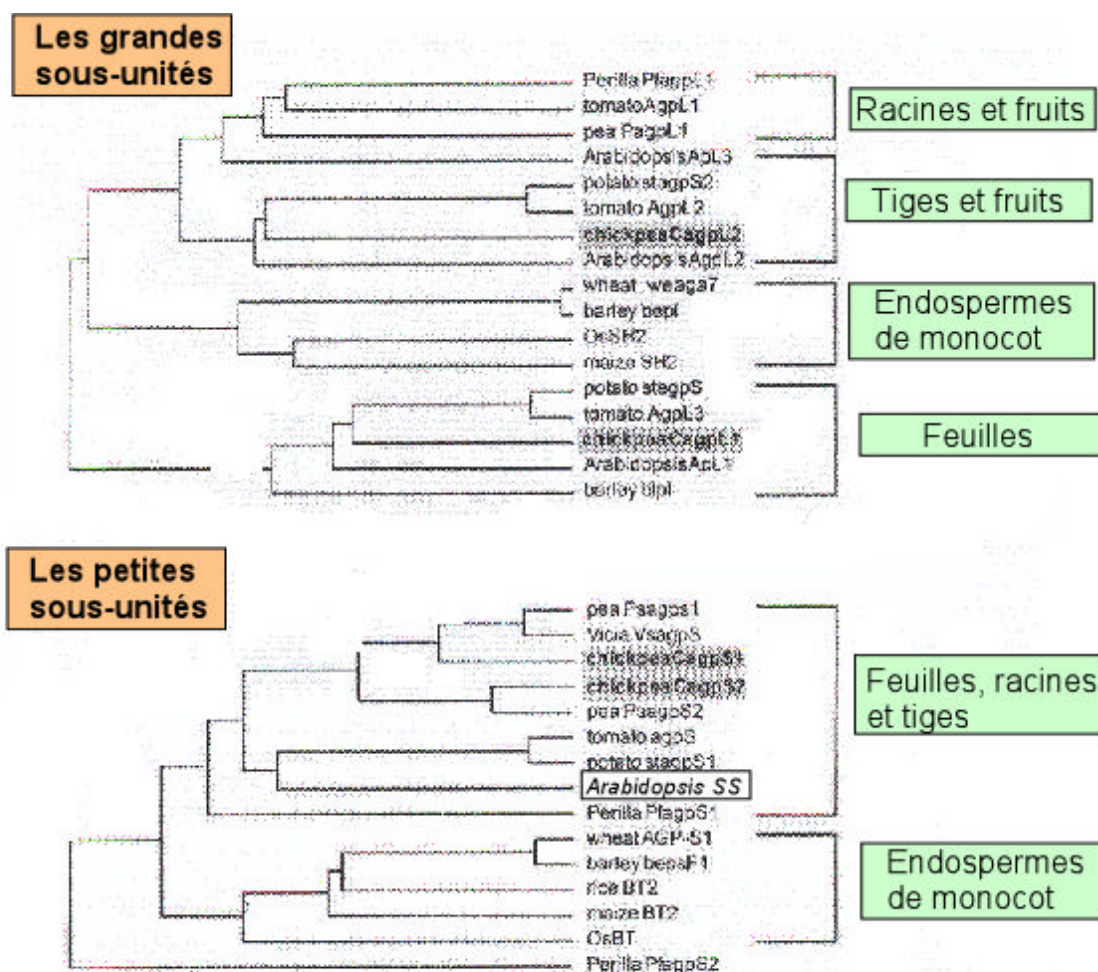


Figure 23 : Dendrogramme des deux sous unités de l'AGPase d'après Sokolov *et al.*, 1998.

Le groupe des isoformes des grandes sous-unité peut être divisé en quatre groupe : (1) Les sous-unités découvertes à la fois dans les racines et les fruits, dans les tiges et les fruits (2), celles qui sont spécifiques de l'endosperme des monocotylédones (3) et enfin celles qui sont spécifiques des feuilles (4).

Dans le cas des petites sous-unités, il n'existe encore que deux groupes. Le premier rassemble les petites sous-unités de feuilles, de racines et de tiges, alors que le deuxième regroupe celles qui sont spécifiques de l'endosperme de monocotylédones. En italique, nous retrouvons la petite sous-unité *SS* d'*Arabidopsis* qui, au laboratoire, a servi à la production d'anticorps.

1998). Inversement, la surexpression de l'AGPase chez des plantes transformées, a permis de mettre en évidence une augmentation de la production d'amidon (Sweetlove *et al.*, 1996).

6.2 Les isoenzymes de l'AGPase

Il est à présent établi que les deux sous-unités sont encodées par deux familles de gènes distinctes mais homologues (Sokolov *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 1998). Une comparaison des séquences codant pour les deux sous-unités fait clairement ressortir une plus grande homogénéité entre les gènes codant pour la petite sous-unité qu'entre ceux codant pour la grande. Les membres de chacune de ces familles semblent opérer dans différents tissus (embryon, endosperme, feuilles et cotylédons) de nombreuses espèces. Ainsi, chez *Arabidopsis*, il existe au moins quatre gènes (non caractérisés) codant pour l'AGPase : *aps*, qui code pour la petite sous-unité et *apl1*, *apl2*, *apl3* qui codent pour la grande. L'isoforme Apl1 est produite dans les cellules du mésophylle foliaire alors qu'Apl2 et Apl3 sont confinées dans d'autres tissus comme le chlorenchyme, les cellules compagnes, les cellules épidermiques... L'ApS est, pour sa part, produite dans l'ensemble de ces tissus. Il n'y a donc pas de contrainte apparente d'association de la petite sous unité de l'AGPase avec l'une ou l'autre des grandes sous-unité, puisque l'enzyme résultante est toujours active (Sokolov *et al.*, 1998).

Les séquences protéiques peuvent être logiquement classées en deux groupes (Figure 23): un premier qui regroupe les isoformes de la petite sous-unité, et un second pour ceux de la grandes sous-unité. Ensuite, au sein de ces deux groupes, des sous-groupes qui représentent les lieux d'expression privilégiée des isoformes des différentes sous-unités sont ensuite distingués. Le groupe des isoformes de la grande sous-unité est ainsi divisé en quatre sous-groupes (Figure 23): les sous-unités localisées à la fois dans les racines et les fruits (AgpL1 de tomates), un autre spécifique des tiges et des fruits (ApL3 d'*Arabidopsis*, AgpL2 de tomates). Un troisième sous-groupe comprend les isoformes exprimés uniquement dans l'endosperme de monocotylédone (SH2 de maïs), tandis que le quatrième est spécifique des feuilles (AgpL3 de tomates, AgpL1 d'*Arabidopsis*). Deux sous-groupes sont à distinguer pour les petites sous-unités, un premier qui regroupe les S-AGP de tiges, feuilles et de racines (AgpS de tomates, Aps d'*Arabidopsis*) et un deuxième englobant les S-AGP spécifiques de l'endosperme (S-AGP de maïs, de riz, de blé...) (Singh *et al.*, 2002) (Figure 23).

La présence de nombreuses sous-unités régulatrices, qui présentent moins d'homologie de séquences entre elles, permet de penser que les AGPase formées avec ces différentes sous-unités présentent des propriétés allostériques différentes. On peut dès lors supposer que la S-AGP d'*Arabidopsis* spécifique des tiges, des feuilles et des racines forme une enzyme active avec soit l'AgpL1 des feuilles, soit l'AgpL2 ou l'AgpL3 des tiges et des fruits. Ces AGPase différentes peuvent présenter, localement, des sensibilités différentes envers leurs activateurs et inhibiteurs (Sokolov *et al.*, 1998).

6.3. Modulation de l'expression de l'AGPase

Nakata et Okita (1995) ont montré que les niveaux d'expression des petites et des grandes sous-unités de

l'AGPase de pomme de terre augmentent en fonction de la taille du tubercule en développement.

L'expression de l'AGPase est aussi régulée en fonction de la concentration en saccharose. Pour la tomate, par exemple, l'induction de la transcription des gènes des différentes sous-unités (grandes ou petites) s'opère clairement après incubation dans le saccharose. Cette induction se fait aussi bien dans les jeunes feuilles que dans les feuilles matures, ce qui montre que l'induction au saccharose peut avoir lieu aussi bien dans les organes consommateurs que producteurs.

Il semble que la production des SAGP et L-AGP soit bien contrôlée différemment par la présence de saccharose, certains gènes y étant sensibles et d'autres non : l'injection de saccharose dans un jeune fruit (10 JAF) provoque l'augmentation du niveau de transcription de certaines sous-unités (AGP L1 de la tomate) dans les trois heures. Cette réponse semble atteindre un maximum dans les 6h après l'injection et se maintenir pendant 24h, alors que pour les autres sous-unités aucun changement d'expression n'est observé (Li *et al.*, 2002).

Li et ses collaborateurs (2002) ont découvert sur le promoteur d'un gène codant pour une L-AGP de tomate (AgpL1), des boîtes ayant des homologues avec des séquences sensibles au saccharose. Dans une des premières (de -2470 à -2450 pb), ils ont mis en évidence deux éléments qui présentent 86% d'homologie avec des régions du promoteur de gènes de la sporamine de la patate douce. Ces gènes qui interviennent dans le stockage des protéines, sont régulés par le saccharose et nécessitent la présence de cette séquence pour être sensible au saccharose. Parmi les autres séquences, ils en ont identifié qui présentent une homologie de 87% avec une séquence de la sucrose synthase de maïs, démontrée pour être sensible au saccharose (boîte -2000 à -1986 pb). La découverte de ces boîtes permet donc d'affirmer que les différentes sous-unités sont régulées par le saccharose et cela aussi bien dans les feuilles que dans les fruits, même si toutes les sous-unités ne répondent pas de la même manière (Li *et al.*, 2002).

6.4. La localisation

Dans des cellules non-photosynthétisantes telles des cellules de soja cultivées en suspension, l'AGPase est largement voire presque exclusivement concentrée dans les amyloplastes, alors que dans les cellules photosynthétisantes, l'enzyme est localisée à l'intérieur des chloroplastes.

Des marquages immunocytochimiques ont démontré que de l'AGPase est à la fois localisée dans le cytoplasme et dans les plastes des cellules du péricarpe de tomate en développement. Dans les plastes, l'AGPase est plus particulièrement confinée dans le stroma et à la surface des grains d'amidon (Chen *et al.*, 1998). De l'AGPase cytosolique a été mise en évidence dans l'endosperme de maïs et de pois en renfort métabolique de l'activité de l'AGPase plastidiale. Un transporteur spécifique d'ADP-glucose a d'ailleurs été identifié à l'intérieur des amyloplastes, ce qui confirme son rôle dans la synthèse de l'amidon de réserve (Denyer *et al.*, 1996).

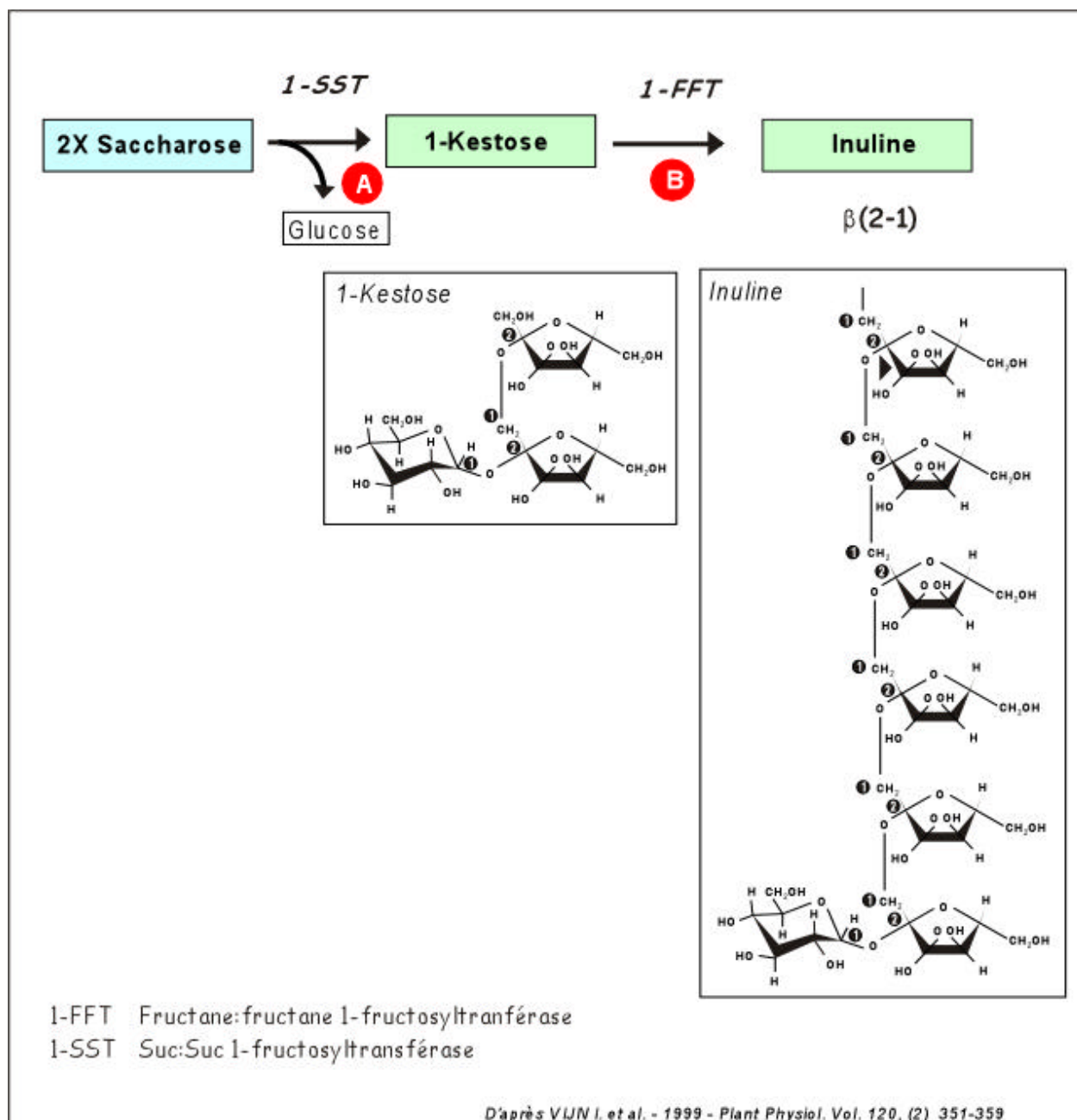


Figure 24 : Synthèse d'inuline d'après Vijn et al., 1999

La synthèse de l'inuline se déroule dans la vacuole et fait intervenir deux enzymes : la sucrose:sucrose 1-fructosyltransférase (1-SST) et la fructane:fructane 1-fructosyltransférase (1-FFT). La SST catalyse le transfert d'un résidu fructose au départ d'une molécule de saccharose vers une autre molécule de saccharose pour former le 1-kestose (A) qui représente la molécule de base de la synthèse de l'inuline. La FFT, quant à elle, transfère des résidus fructoses d'une molécule d'inuline à une autre dans le but d'allonger ou de raccourcir les chaînes d'inuline (B).

En résumé, les organes hétérotrophes (méristèmes, fruits, racines...) requièrent un apport continu de carbone réduit. Chez la plupart des plantes supérieures, le carbone réduit est transporté sous forme de saccharose, qui peut être utilisé dans différentes voies de synthèse (paroi, amidon...) ou oxydatives. Parmi les enzymes responsables de ces voies métaboliques, la SuSy et l'AGPase sont deux enzymes clés : la SuSy est impliquée dans la synthèse de l'UDP-glucose, précurseur de polysaccharides pariétaux, au départ du saccharose. L'AGPase, elle, contrôle la synthèse du polysaccharide de réserve qu'est l'amidon. Les gènes de ces deux enzymes sont d'ailleurs considérés comme des marqueurs moléculaires importants des premiers stades de développement des feuilles de nombreuses espèces (Pien *et al.*, 2001). L'activité relative d'une enzyme par rapport à l'autre détermine l'orientation métabolique de la cellule, soit vers la formation d'une paroi cellulaire, qui peut constituer la structure cytologique terminale d'une cellule (ex. de la cellulose essentiellement dans la fibre de coton), soit vers l'accumulation de polymères de réserve (ex. de l'amidon chez des tubercules de pommes de terre).

7. L'allocation du carbone chez *Cichorium intybus*

Si la plupart des végétaux stockent l'amidon et quelques fois le saccharose comme polysaccharide de réserve, quinze pour-cent d'entre eux sont cependant capables de stocker d'autres polysaccharides tels des polyfructanes, dont un des principaux isomères est l'inuline. L'inuline, que l'on retrouve principalement chez les Astéracées comme la chicorée, est constituée d'une chaîne d'unités de fructose liées en β -1,2- (30 à 35 résidus en moyenne). Comme le saccharose, l'inuline est stockée dans les vacuoles mais, contrairement au saccharose qui est synthétisé dans le cytosol, l'inuline est synthétisée dans la vacuole.

La synthèse de l'inuline fait intervenir deux enzymes : la sucrose sucrose 1-fructosyle transferase (1-SST) et la fructane fructane 1-fructosyle transferase (1-FFT). La SST catalyse le transfert d'un résidu fructose au départ d'une molécule de saccharose vers une autre molécule de saccharose, pour former le 1-kestose qui représente la molécule de base de la synthèse de l'inuline (ou la plus petite chaîne d'inuline). La FFT, quant à elle, transfère des résidus fructoses d'une molécule d'inuline à une autre, dans le but d'allonger ou de raccourcir les chaînes d'inuline (Vijn et Smeekeens, 1999) (Figure 24).

L'inuline accumulée par la chicorée durant la période allant du deuxième au cinquième mois de son développement représente jusqu'à 80% du poids frais de son unique racine (Druart *et al.*, 2001). Le métabolisme des fructanes joue un rôle important dans la protection des végétaux confrontés à un stress hydrique ou au froid. Comme l'amidon de réserve, l'inuline est une source de carbone utile dans ces conditions qui en diminuent l'apport. Les différentes chaînes d'inuline ont aussi d'autres applications au niveau de l'industrie alimentaire. En effet, les chaînes courtes démontrent un pouvoir sucrant élevé, alors que les chaînes longues ont un faible pouvoir calorifique.

On ne sait actuellement pratiquement rien des rôles ni de la SuSy, ni de l'AGPase chez *C. Intybus*. C'est

pourquoi nous avons décidé de nous y intéresser en tirant parti d'outils présents au laboratoire : des polysérums dirigés respectivement contre une SuSy et une AGPase recombinantes, utilisables pour l'identification des enzymes correspondantes chez la chicorée.

8. L'immunodétection

Relativement faciles à mettre en œuvre, les techniques d'immunodétection sont très performantes : la grande variété de molécules différentes que peuvent reconnaître les anticorps et les nombreuses possibilités d'utilisation de ces derniers tant pour marquer des cellules en vue d'une observation microscopique que pour l'identification, voire le dosage d'un antigène donné, sont à l'origine de leur succès. Différents marqueurs ou traceurs permettent la visualisation, la localisation et la quantification des complexes antigène-anticorps : enzymes, fluorochromes, particules d'or colloïdal, ... Leur choix dépend des buts recherchés et des limites du système expérimental ou des instruments dont on dispose. L'anticorps est l'outil principal de l'immunodétection : la littérature fait état de l'existence de différents sérums et anticorps monoclonaux produits contre la SuSy et l'AGPase, repris dans les tableaux suivants:

Anticorps	Spécificité	Références
Antisérum de lapin	AGPase de feuilles d'épinards	Fu <i>et al.</i> , 1998
Antisérum de lapin	L-AGP du mutant Sh2	Greene et Hannah, 1998 Smidansky <i>et al.</i> , 2000
Antisérum de lapin	S-AGP du mutant Bt2	Greene et Hannah, 1998 Smidansky <i>et al.</i> , 2000
Antisérum de lapin	S-AGP et L-AGP exprimées dans <i>E.coli</i>	Wang <i>et al.</i> , 1998
Antisérum de lapin	isoformes SuS1, 2, 3 de la SuSy de riz	Wang <i>et al.</i> , 1999
Antisérum de souris	isoforme SSI de la poire Japonaise	Tanase et Yamaki, 2000
Anticorps <i>monoclonaux</i>	isoforme Sh1 de maïs	Nolte et Koch, 1993 Koch <i>et al.</i> , 1992
	isoforme SuS1 de maïs	Nolte et Koch, 1993 Koch <i>et al.</i> , 1992

Les sérums décrits ont, pour la plupart, été produits à partir de protéines isolées au départ de tissus. Les

polysérums disponibles dans notre laboratoire ont été obtenus suite à l'immunisation de lapins soit avec une sucrose synthase (SS1) d'*Arabidopsis*, soit avec une portion de petite sous-unité de l'AGPase (Aps) d'*Arabidopsis*, toutes deux produites en bactéries.

9. L'immunomarquage en Western blots

La mise en évidence de protéines, préalablement séparées par électrophorèse et transférées sur une membrane, a longtemps été réalisée grâce à l'utilisation de radio-isotopes couplés à des anticorps secondaires. Néanmoins, il existe des alternatives non radioactives comme la chémiluminescence – kits ECL – où la lumière est émise comme produit d'une réaction chimique, et la chimifluorescence – kits ECF – où la lumière absorbée par une espèce est ensuite ré-émise, deux méthodes très souvent employées en raison de leur sensibilité et de leur facilité d'utilisation.

La détection en chémiluminescence résulte d'une oxydation de luminol en conditions alcalines, catalysée par une peroxydase fixée de façon covalente à des anticorps secondaires. Ainsi, des blots marqués avec des anticorps primaires sont ensuite incubés avec des anticorps secondaires couplés à une peroxydase dont l'activité est révélée en présence d'un milieu composé de luminol, de 4-iodophénol (enhancer) et d'eau oxygénée. Les radicaux libres fabriqués par la peroxydase à partir de l'eau oxygénée oxydent le luminol, qui se retrouve alors dans un état excité et qui retourne à son niveau basal d'énergie en émettant de la lumière. Les photons émis sont détectés en autoradiographie ou à l'aide d'un fluor-imageur (www.amershambiosciences.com).

La détection en chimifluorescence est quant à elle obtenue suite à la conversion enzymatique d'une substance peu ou pas fluorescente (substrat fluorogénique) en un produit fluorescent. Les composés fluorogéniques sont capables de fonctionner avec une grande variété d'enzymes. L'anticorps secondaire peut, par exemple, être couplé à une phosphatase alcaline qui clive un groupe phosphate du substrat fluorogénique et le transforme ensuite en produit qui, après excitation, émet un signal fluorescent détectable et quantifiable à l'aide d'un fluorimager (www.amershambiosciences.com).

La détection en fluorescence peut aussi être réalisée de manière directe, sans amplification enzymatique. Dans ce cas, les anticorps secondaires sont couplés à des fluorochromes qui peuvent être excités et distingués selon leurs propres spectres d'absorption et d'émission. L'utilisation de fluorochromes différents permet aussi d'effectuer ce que l'on appelle du multiplexage, c'est à dire une détection simultanée de différentes protéines transférées sur une même membrane. Pour plus de facilité, cette technique demande que les anticorps primaires spécifiques des protéines à détecter soient directement couplés aux fluorochromes. La détection par l'intermédiaire d'un système d'acquisition (fluorimager et filtres) permet alors de distinguer les protéines entre elles selon la longueur d'onde d'émission des fluorochromes couplés à leurs anticorps respectifs. Nombre de logiciels permettent ensuite de traiter les images obtenues, quantitativement si nécessaire.

Le seuil de sensibilité de l'immunofluorescence permet de détecter un polypeptide sans devoir soumettre systématiquement chacun des spots présents sur la membrane à une méthode comme la spectrométrie de masse, afin d'identifier la protéine recherchée, surtout dans le cas d'électrophorèse à deux dimensions (Fluorescence imaging technical manual, Amersham Pharmacia Biotech, 2000).

Dans notre cas, l'immunofluorescence s'est imposée, notre but étant d'identifier rapidement la SuSy et l'AGPase dans le protéome de la chicorée.

OBJECTIFS DU MEMOIRE

II. Objectifs du mémoire

L'analyse du métabolisme des glucides chez les végétaux a permis de mettre en évidence l'importance des nombreuses enzymes contrôlant les multiples voies qui le composent. Deux de ces enzymes jouent cependant un rôle crucial. Il s'agit de la sucrose synthase et l'ADP-glucose pyrophosphorylase, qui contrôlent respectivement le métabolisme du saccharose pour la première, et de l'amidon pour la seconde. Ces deux réactions consomment en effet une grande partie du carbone fixé par les végétaux.

L'objectif que nous nous sommes assigné est d'élucider l'implication de la SuSy et de l'AGPase dans l'allocation du carbone chez la chicorée qui, contrairement à la plupart des végétaux, stocke non pas de l'amidon ni du saccharose comme polysaccharide de réserve, mais de l'inuline.

Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, tenté de mettre au point une technique d'immunodétection fiable combinant Western-blot et immunofluorescence, et utilisant des anticorps spécifiques des formes recombinantes de SuSy et d'AGPase. Dans un deuxième temps, nous avons essayé d'appliquer cette technique à des extraits de protéines solubles de radis et de chicorée afin de détecter une forme naturelle de SuSy et d'AGPase chez ces végétaux.

MATERIEL ET METHODES

III. Matériel et méthodes

1. Production des protéines recombinantes

1.1. Mise en culture des stocks bactériens

Matériel

- ?? LB liquide, pour 1L:
 - 10g de Bactotryptone,
 - 5g de Yeast extract,
 - 10g de NaCl,
 - mettre à pH 7 autoclaver.
- ?? LB-agar idem que LB liquide + 15g d'agar / L.
- ?? Ampicilline (Sigma), solution stock 100 mg/ml en H₂O, filtrée sur 0,2 µm et conservée à -20°C.
- ?? Bactéries BL21 DE3 contenant les vecteurs suivants :
 - pET17b-SS
 - pET17b-AGP; conservées à -80°C.

Protocole

1. Préparer 100 ml de milieu LB agar, autoclaver, laisser le milieu dans un bain à 50°C durant 30 minutes.
2. Y ajouter l'ampicilline afin d'obtenir une concentration finale de 100 µg/ml et couler le milieu dans boîtes de pétri et laisser refroidir.
3. Ensemencer ensuite les milieux avec les différentes bactéries et incuber la nuit à 37°C.
4. Conserver les boîtes contenant les colonies bactériennes à 4°C.

1.2. Culture de vérification

Cette culture a été entreprise afin de vérifier l'expression des protéines cibles par les bactéries.

1.2.1. Petite culture de 5ml

Matériel

- ?? LB liquide, pour 1L:
 - 10g de Bactotryptone
 - 5g de Yeast extract
 - 10g de NaCl
 - mettre à pH 7 autoclaver
- ?? Ampicilline(Sigma), solution stock 100 mg/ml en H₂O, filtrée sur 0,2 µm et conservée à -20°C
- ?? IPTG : Isopropyl-β-D-thiogalactoside, solution stock 100mM en H₂O, filtrée sur 0,2 µm et conservée à -20°C.

Protocole

1. Ensemencer 5 ml de milieu LB additionné de 100 µg/ml d'ampicilline avec une colonie de bactéries BL21 DE3 contenant le vecteur pET approprié. Incuber à 37°C sous agitation.
2. Après 2 heures d'incubation, mesurer la densité optique de la culture à 600 nm.
3. Lorsque la densité optique est entre 0,4 et 0,6 (phase exponentielle de croissance) ; ajouter l'IPTG à une concentration finale de 1mM.
4. Après 3heures de culture à 37°C sous agitation, prélever 500 µl de suspension bactérienne en vue de l'extraction des protéines recombinantes.

1.2.2. Extraction des protéines au départ de 500 μ l de suspension bactérienne

Matériel

- ?? Tampon de chargement [5x]: Tris 250 mM, DTT 500mM, SDS 10%, β -Mercaptoéthanol 10%, Glycerol 50%
- ?? Sonicateur « Bandelin sonoplus » HD 2070 (Bandelin electronic, Germany).

Protocole

1. Centrifuger 500 μ l de suspension bactérienne à 13000 rpm pendant 5 minutes à 4°C.
2. Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 50 μ l de tampon de chargement [1x]
3. Chauffer les échantillons à 100 °C pendant 10 minutes, les mettre sur glace et casser les bactéries par sonication pendant 1 minute à une puissance de 40%.
4. Placer ensuite l'échantillon à -20°C durant 5 minutes et le décongeler afin d'en prélever 10 μ l en vue de son analyse en gel SDS-PAGE.

1.3. Culture en vue de l'isolement de la protéine d'intérêt par le « T7-Tag affinity purification kit » (Novagen)

1.3.1. Culture d'induction en vue de l'extraction des protéines d'intérêts

Matériel

LB liquide, pour 1L:

- 10g de Bactotryptone
- 5g de Yeast extract
- 10g de NaCl
- mettre à pH 7 autoclaver

- ?? Ampicilline(Sigma), solution stock 100 mg/ml en H₂O, filtrée sur 0,2 μ m et conservée à -20°C
- ?? IPTG : Isopropyl- β -D-thiogalactoside, solution stock 100mM en H₂O, filtrée sur 0,2 μ m et conservée à -20°C.

Protocole

1. Ensemencer 6 ml de LB additionné de 100 μ g/ml d'ampicilline avec les souches BL21 DE3 transformées. Incuber à 37°C sous agitation.
2. Après 2 heures d'incubation, mesurer la densité optique de la culture à 600nm.
3. Lorsque la densité optique est entre 0,4 et 0,6 ; mettre la culture à 4°C pendant la nuit.
4. Centrifuger la culture liquide (2-4ml) à 4000 rpm à 4°C durant 30 secondes.
5. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 4 ml de milieu LB frais.
6. Ensemencer 100 ml de LB contenant 100 μ g/ml d'ampicilline avec les 4 ml de culture de la souche BL21 DE3 transformée. Incuber à 37°C pendant 2 heures sous agitation (250 rpm)
7. Mesurer la densité optique de la culture à 600nm et lorsque celle-ci est comprise entre 0,4 et 0,6 ; ajouter l'IPTG à une concentration finale de 1mM.
8. Incuber les bactéries à 37°C pendant 3 heures sous agitation et les collecter ensuite par centrifugation en vue de l'extraction des protéines.

1.3.2. Extraction des protéines insolubles (protocole Novagen)

Cette procédure permet d'isoler les corps d'inclusion contenant les protéines recombinantes dans du tampon Bind/Wash [1x] au quel nous avons ajouté de l'urée (6M) permettant de solubiliser les protéines.

Matériel

- ?? Kit d'extraction par affinité T7-Tag (Novagen) :
 - Tampon Bind/Wash T7 Tag [10x] : Na_2HPO_4 42,9 mM, KH_2PO_4 14,7 mM, KCl 27 mM, Tween 20 1%, Azide de sodium 0,02% (pH 7,3).
- ?? Membrane de porosité de 0,45 μm (Millipore)
- ?? Sonicateur « Bandelin sonoplus » HD 2070 (Bandelin electronic, Germany).
- ?? Centrifugeuse J2-21 Beckame

Protocole

1. Récolter les bactéries par centrifugation à 5500 rpm durant 5 minutes à 4°C.
2. Bien éliminer le surnageant et laisser « sécher » le culot quelques minutes.
3. Resuspendre le culot dans 10 ml de tampon Bind/Wash ne contenant pas d'urée.
4. Placer l'échantillon dans un bain de glace et casser les bactéries par sonication 3x1 minute à une puissance de 40%.
5. Centrifuger à 13000 rpm à 4°C pendant 15 minutes afin de collecter les corps d'inclusion et resuspendre le culot dans 5 ml de Bind/Wash [1x] sans urée en soniquant 3x1 minute
6. Recentrifuger l'échantillon une fois comme décrit ci-dessus.
7. Eliminer le surnageant et laisser « sécher » le culot quelques minutes.
8. Resuspendre le culot dans 10 ml de Bind/Wash [1x] contenant de l'urée (6M).
9. Incuber sur glace pendant une heure afin de solubiliser complètement les protéines.
10. Eliminer les composants tout à fait insolubles en centrifugant à 18000 rpm durant 20 minutes à 4°C.
11. Filtrer le surnageant au travers d'une membrane de 0,45 μm avant de procéder à la purification sur colonne T7-Tag. Conserver 50 μl de cette filtration afin de vérifier l'efficacité de l'extraction par dépôt sur gel SDS-PAGE.
12. Diluer l'extrait avec du tampon Bind/Wash [1x] afin de ramener la concentration en urée de 6 à 2M avant son chargement sur la colonne.

Ensuite deux possibilités peuvent se présenter :

- ?? La diminution des forces ioniques de la solution entraîne une précipitation des protéines (la solution devient trouble), il faut alors centrifuger l'échantillon à 15000 rpm durant 20 minutes à 4°C. Resuspendre ensuite le culot dans 200 μl de tampon de chargement [1x] et le conserver à -20°C. Ce qui est le cas des protéines recombinantes AGPase-T7-tag
- ?? Si les protéines ne précipitent pas charger le surnageant sur la colonne afin de réaliser la purification. Ce que nous avons dû faire dans le cas de la protéine recombinante SuSy-T7-tag.
- ??

1.3.3. Purification des protéines avec le « T7-Tag affinity purification kit »

Principe

Le kit T7-Tag affinity de Novagen permet la purification des protéines de fusion. Il est basé sur l'interaction spécifique entre un peptide T7-Tag présent sur la protéine recombinante et un anticorps anti-T7-tag immobilisé sur une résine de chromatographie.

Matériel

?? Kit d'extraction par affinité T7-Tag (Novagen) :

- *Tampon Bind/Wash T7 Tag [10x]*: Na_2HPO_4 42,9 mM, KH_2PO_4 14,7 mM, KCl 27 mM, Tween 20 1%, Azide de sodium 0,02% (pH 7,3).
- *Tampon d'élution [10x]*: acide citrique 1M (pH 2,2)
- *Tampon de neutralisation [1x]*: Tris 2M (pH 10,4)

Protocole

1. Mettre la colonne de chromatographie sur un support approprié et déposer 5 ml de tampon Bind/Wash [1x] maintenu à température ambiante, afin d'éliminer toute présence de bulles d'air dans le verre fritté.
2. Laisser la résine T7-tag antibody agarose s'équilibrer à température ambiante et la déposer entièrement sur la colonne de chromatographie.
3. Equilibrer la résine par lavage avec 10 ml de tampon Bind/Wash [1x] et charger ensuite la solution protéique (? 30 ml) maintenue à température ambiante.
4. Récolter la fraction protéique non liée à la colonne (le flow-through), qui sera analysée sur gel SDS-PAGE en même temps que les éluats.
5. Laver la colonne avec 10ml de tampon Bind/Wash [1x].
6. Préparer 5 tubes Eppendorf contenant 150 μ l de tampon de neutralisation.
7. Eluer les protéines retenues à la colonne avec 5 fois 1 ml de tampon d'élution [1x], récolter ? 1ml par tube Eppendorf et mélanger immédiatement le contenu de chaque tube par inversion afin d'homogénéiser l'éluat et le tampon de neutralisation.
8. Laver la colonne avec 10 ml de tampon Bind/Wash [1x]. Mettre des bouchons de part et d'autre de la colonne et la stocker à 4°C, de même que les tampons.

2. Analyse des protéines

2.1. Electrophorèse en gel SDS-PAGE (méthode de Laemmli)

Principe

Les gels de polyacrylamide sont utilisés pour la séparation des protéines. La majorité des électrophorèses de protéines se font en conditions dénaturantes afin d'éliminer l'action de certains facteurs qui pourraient modifier la mobilité électrophorétique des protéines (formation de multimères, agrégation, structure tertiaire, charge respective). Le sodium dodécyl sulfate (SDS) est utilisé afin d'éviter ces problèmes. Par conséquent, lors d'une électrophorèse en conditions dénaturantes (où le champs électrique et la viscosité demeurent constants), seule la taille des protéines intervient dans la migration.

Matériel

- ?? *Tampon de chargement [5x]*: Tris 250 mM, DTT 500 mM, SDS 10%, β -Mercaptoéthanol 10%, Glycérol 50%, Bleu de Bromophénol 0,25% (pH 6,8) ;
- ?? Acrylamide/Bis 30% (BioRad),
- ?? SDS : Sodium dodecyl sulfate (Sigma),
- ?? APS : Ammonium persulfate (Sigma),
- ?? TEMED : N,N,N',N'-tetraméthyl-éthylènediamine (Sigma),
- ?? *Tampon d'électrophorèse*: Tris-HCl 25mM (pH 8,3), Glycine 250 mM, SDS 0,1%
- ?? *Cuve d'électrophorèse*: Mini- PROTEAN II and ready gel accessories (Bio-Rad, 165-2944) et Protean II xi cell (Bio-Rad, 165-1814)
- ?? *Etalons de poids moléculaire*: -Pre-stained SDS-PAGE standards (Bio-Rad, n° Cat 161-18): 211, 122, 80, 51, 35,9, 28,6, 20,8, 6,7 kDa
 -Precision protein standards (Bio-Rad, n° Cat 161-0372): 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 15, 10 kDa.

- ?? *Solution de coloration* : Bleu de Coomassie Brilliant Blue R250 0,1%, Méthanol 40%, H₂O 50%, Acide acétique 10%
- ?? *Solution de décoloration* : Méthanol 40%, Acide acétique 10%, H₂O
- ?? Gel-Air-Dryer (BioRad)

Protocole

Remarques :

- ?? Utilisation de peignes 10 puits de 0.75 mm d'épaisseur (Bio-Rad) permettant un chargement maximum de 48 ?l et de peignes 5 puits (Bio-Rad) dans des gels de 1,5 mm dont la capacité maximum de chargement est de 200 ?l par puits.
- ?? Le pourcentage du gel utilisé dépend du poids moléculaire de la protéine que l'on veut détecter. Dans notre cas un gel 8%, nous a permis de mettre en évidence les deux protéines sur un même gel puisque les enzymes recombinantes ont des poids moléculaires de 95 kDa pour la SuSy et 27 kDa pour l'AGPase.

Composition des gels

	<i>Running gel 8% (10ml)</i>	<i>Stacking 5% (5ml)</i>
H ₂ O	4,6 ml	3,4 ml
30% acrylamide mix	2,7 ml	0,83 ml
Tris *	2,5 ml	0,63 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,05 ml
APS 10%	0,1 ml	0,05 ml
TEMED	0,006 ml	0,005 ml

* Tampon Tris 1.5 M (pH 8.8) dans le cas du Running gel et tampon Tris 1 M (pH 6.8) dans le cas du Stacking gel.

- ?? Après avoir ajouté les deux catalyseurs (APS et TEMED) au mélange acrylamide-bisacrylamide, couler le running Gel entre deux plaques de verre séparées par des spaceurs.
- ?? Après polymérisation (± 30 minutes pour les gels de 7x10 cm), placer le peigne et couler le stacking Gel (2ml pour les gels 7x10 cm).
- ?? Après la polymérisation du Stacking Gel (± 30 minutes) placer les gels dans la cuve et remplir cette dernière avec du tampon d'électrophorèse, enlever le peigne et rincer les puits avec quelques ml de tampon d'électrophorèse.

Chargement des échantillons

- ?? Les protéines soumises à l'électrophorèse sont directement solubilisées dans un tampon de chargement [5x] dans les proportions de 2,5 μ l de tampon de 1/5 de bleu pour 4/5 d'échantillon.

Migration

- ?? L'électrophorèse est réalisée dans une cuve prévue à cet effet et sous une tension de 150 V pour les gels de dimension 7x10 cm durant 45 à 50 minutes.

Détection des protéines

- ?? Après migration électrophorétique, le gel est retiré de son support de verre et plongé dans la solution de coloration pendant 30 minutes. Afin de visualiser les protéines, on décolore progressivement le gel avec la solution de décoloration.
- ?? Plonger ensuite le gel dans de l'eau désionisée avec du glycérol 10% en attendant de le sécher avec le Gel-Air-Dryer.

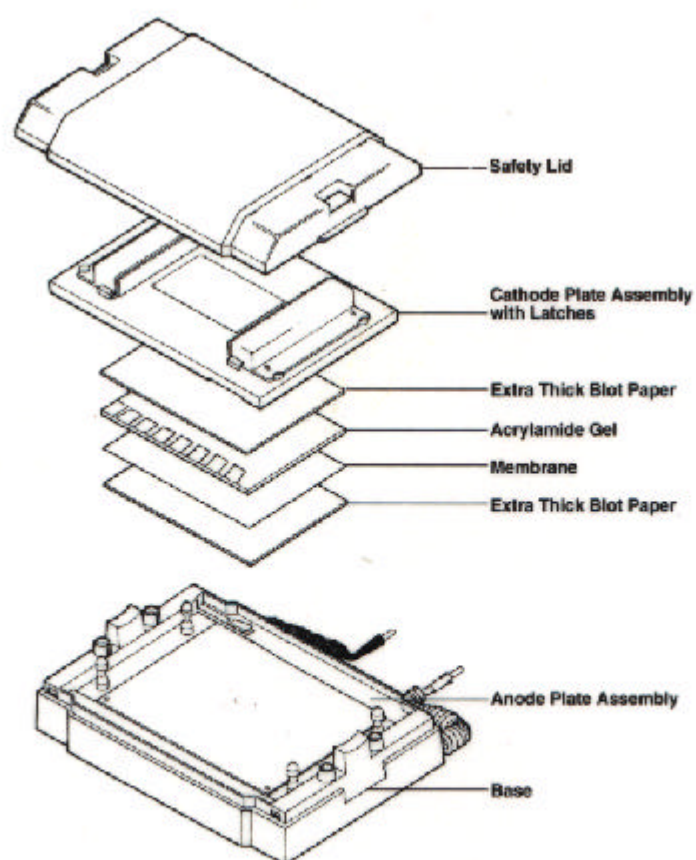


Figure 25: Montage de l'appareil de transfert semi-dry (170-3940) d'après le trans-blot semi-dry quick reference guide, BIO-RAD.

2.2. Western-blotting

Matériel

?? Membrane de PVDF (polyvinylidene fluoride), hydrophobic, 0,2 μm , WESTRAN®, Schleicher and Schuell,

?? *Tampon de transfert Bio-Rad* : -Tris 48 mM
 - Glycine 39mM
 - MeOH analytique 20 %
 -SDS 0.0375 %

Remarque : Ce tampon ne nécessite pas de mise à pH

?? Méthanol

?? Papier absorbant BioRad : Extra thick blot paper (8,6 x 13,5 cm)

?? Appareil de transfert semi-dry (Bio-Rad) : « Trans-blot Semi-Dry Transfer Cell » branché à une source Pharmacia LKB, GPS 200/400, 125 VA ; 50/60 Hz

Protocole

1. Découper un morceau de membrane PVDF correspondant à la taille du gel SDS-PAGE
 2. Incuber la membrane de PVDF 5 secondes dans le méthanol suivie directement d'une incubation de 5 minutes dans l'eau désionisée. Equilibrer ensuite la membrane et les papiers absorbants dans le tampon de transfert durant au moins 30 minutes.
 3. Après l'électrophorèse, équilibrer le gel dans le tampon de transfert et assembler le montage de transfert dans l'appareil semi-dry en évitant la formation de bulles d'air (Figure 25).
 4. Réaliser le transfert des protéines du gel SDS-PAGE vers la membrane PVDF pendant 25 minutes, sous une alimentation stable de 15 Volts.
- Pour vérifier que le transfert a bien eu lieu, on procède à la coloration et à la décoloration du gel SDS-PAGE.

2.3. Immunomarquage après Dot et Western blots

La détection des protéines, en dot-blot et Western-blot, est basée sur la reconnaissance d'un antigène d'intérêt immobilisé sur un support solide, par des anticorps spécifiques (présents dans le sérum des animaux immunisés) eux-mêmes reconnus par des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome.

L'observation de la membrane à différents temps d'excitation permet la détection des complexes antigène immobilisé-anticorps formés.

Matériel

?? *Tampon TBS* : -Tris HCl 20mM (pH 7,6)
 -NaCl 137 mM.

?? *Tampon TBST* : - Tampon TBS +0.1% de Tween 20

?? *Agent bloquant* : - Tampon TBST +5 % de poudre de lait .

?? *Anticorps primaires* : -polysérum de lapin anti-sucrose synthase (SuSy) recombinante.
 -polysérum de lapin anti-ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) recombinante (aliquotés et conservés à -20°C).

?? *Anticorps secondaires* : -Anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome Alexa 488 (Molecular Probes) .
 -Anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome Alexa 594 (Molecular Probes) .
 (aliquotés et conservés à -20°C et à l'abri de la lumière)

?? Fluorimètre : Fluor-S® MAX multiimager system (Bio-Rad)

-Source d'excitation UV par épi-illumination.

Temps d'exposition recommandé : .0,1 à 3 secondes pour un marquage qui utilise la fluorescence (Fluor-S® MAX multiimager, hardware instruction manual; BIO-RAD).

-Une "camera CCD" (Charge Coupled Device) est un appareil photo numérique beaucoup plus sensible qu'une plaque photographique.

-Filtres:

-530DF60 : sélectionnant les longueurs d'ondes d'émission entre 500 et 560 (détection Alexa 488).

-610LP : sélectionnant les longueurs d'ondes d'émission de 610nm et au-delà (détection Alexa 594).

Protocoles

L'analyse en dot-blot constitue un moyen rapide de détermination de la spécificité et des dilutions adéquates des anticorps utilisés.

Le Western-blot permet de déterminer le poids moléculaire des protéines analysées ceci grâce à un étalon de poids moléculaire.

Dot- blot

1. Découper un morceau de taille appropriée de membrane PVDF.
2. Incuber la membrane 5 secondes dans le méthanol suivie directement d'une incubation de 5 minutes dans l'eau désionisée.
3. Déposer 2 fois 1 µl d'échantillon directement sur la membrane.
4. Laisser pénétrer l'échantillon durant 1 minute.
5. Incuber la membrane dans l'agent bloquant à température ambiante durant une heure sous agitation Cette étape de saturation empêche une fixation anarchique des anticorps primaires à la surface de toute la membrane.
6. Laver ensuite la membrane sous agitation avec du TBST selon la séquence suivante :
1x 2 minutes, 1x 15 minutes, 1x 5 minutes.
7. Incuber la membrane dans l'anticorps primaire dilué 1000 fois dans une solution TBST durant 1heure à température ambiante sous agitation.
OU dans le cas d'un test d'épuisement T7-tag : incuber préalablement le polysérum (dilué 1000x dans du TBST) avec une autre protéine de fusion T-tag durant 1h sous agitation. Ensuite incuber la membrane dans le polysérum épuisé durant 1h à température ambiante.
8. Laver la membrane dans la solution TBST selon la séquence présentée en 6.
9. Incuber la membrane dans l'anticorps secondaire (dilué 200x dans du TBST et centrifugé à 5000rpm durant 5 min à 4°C) à température ambiante et à l'obscurité durant une heure sous agitation.
10. Laver la membrane comme au point 6 tout en la protégeant de la lumière.
11. Laisser sécher la membrane 20 minutes à une nuit à l'obscurité pour une meilleure lecture de résultats.
12. Scanner la membrane à l'aide du fluorimètre, afin de visualiser les résultats.

Western-blot

1. Incuber la membrane de PVDF dans l'agent bloquant durant une heure à température ambiante sous agitation
2. Laver ensuite la membrane sous agitation avec du TBST selon la séquence suivante :
1x 2 minutes, 1x 15 minutes, 1x 5 minutes.
3. 1x 2 minutes, 1x 15 minutes, 1x 5 minutes.
4. Incuber la membrane dans l'anticorps primaire dilué 1000 fois dans une solution TBST à 4°C pendant une nuit sous agitation.

OU dans le cas d'un test d'épuisement, incuber préalablement le polysérum dilué 1000 fois dans du TBST avec l'enzyme recombinante durant 1h sous faible agitation.

5. Suite du protocole identique à celui du dot-blot à partir du point 4.

3. Extraction de protéines végétales

Principe

Dans ce protocole, les protéines solubles de tissus végétaux sont extraites dans un tampon aqueux dans le but de les séparer dans un gel dénaturant. Les protéines sont ensuite visualisées par coloration du gel ou par immunodétection après Western-Blot.

Matériel

- ?? Matériel végétal : -Feuilles de radis de 2 semaines
-Plantules de chicorée (6 semaines)
-Feuilles et racine de chicorée adulte.
- ?? Protéase inhibitor cocktail tablets (Complete™) (Roche).
- ?? Azote liquide.
- ?? Polyvinyl pyrophosphate (PVPP).
- ?? Tampons d'extractions :
 1. *Tampon MOPS-NaOH* : (Huber *et al.*, 1996)
 - 50mM de Mops-NaOH; pH 7,5
 - 15mM de MgCl₂
 - 1mM d'EDTA
 - 0,1% de triton X-100
 - 2,5% de glycérol
 - 2,5mM de DTT
 - 1mM de PMSF (stock 10mM)
 2. *Tampon MOPS-NaOH avec inhibiteurs de protéases* : (1 tablette / 25ml de tampon)
 3. *Tampon HEPES -KOH*: (Sweetlove *et al.*, 1996)
 - 200mM d'HEPES-KOH; pH 7,3
 - 1mM d'EDTA
 - 1mM de DTT
 - 1mM de PMSF (stock 10mM)
 4. *Tampon HEPES-KOH avec inhibiteurs de protéases* (1 tablette / 25ml de tampon)
 5. *Tampon Rivard* : (www.agrobiotheque.can)
 - Tris-HCl 100mM, pH 7
 - EDTA 1 mM
 - PMSF 1 mM
 - ?-mercaptoéthanol 0,1 M
 - 1mM de PMSF (stock 10mM)
- ?? Centrifugeuse Biofuge A Heraeus Sepatech.
- ?? Pilon et mortier préalablement pasteurisés.

Protocole

1. Broyer les feuilles ou les racines dans de l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine. *Le matériel végétal doit toujours être gardé congelé pour éviter l'activité de protéases endogènes de la plante.*
2. Peser 20 à 30 mg de PVPP qui sert à capturer les polyphénols et les placer dans un Eppendorf.
3. Ajouter 1 ml de tampon d'extraction ainsi que 100 µl de PMSF 1mM. Il est important de noter que le PMSF n'a pas une durée de vie très longue en solution aqueuse. Il est habituellement gardé dans de l'isopropanol.

Il faut donc le mettre dans le tampon d'extraction moins de 30 minutes avant de l'utiliser.

4. Peser rapidement 0,2 g à 0,3 g de poudre végétale et l'ajouter à la solution d'extraction
5. Laisser le mélange sur la glace pendant 5 à 10 minutes en vortexant périodiquement pour permettre une bonne extraction des protéines.
6. Centrifuger le mélange à 13000 rpm pendant 25 minutes à 4 °C pour récupérer les protéines solubles dans le surnageant.
7. Doser les protéines du surnageant et les stocker à -20 °C.

4. Dosage des protéines

4.1. La méthode Bradford

Cette technique utilise un colorant, le bleu de coomassie, dont la coloration change après adsorption (fixation de façon non covalente) sur des protéines. La fixation est quantitative et peu sensible à la variation de composition des protéines.

Matériel

- ?? Bio-Rad Protein assay
- ?? BSA (Sigma): Stock 2 mg/ml en PBS
- ?? Spectrophotomètre SHIMADSU UV-1601

Protocole

1. Préparer une gamme étalon de 0.2 à 1 mg/ml de BSA diluée en PBS.
2. Déposer 100 µl de chacune des solutions étalons dans des tubes en verre. Le blanc étant constitué de 100 µl de PBS.
3. Mettre également 100 µl des échantillons à doser dans des tubes.
4. Ajouter 5 ml de réactif de dosage préalablement dilué 5x dans l'eau désionisée.
5. Vortexer, laisser reposer 5 minutes et lire l'absorbance à 595 nm
6. Déterminer la concentration en protéine de l'échantillon à partir de la droite de régression obtenue.

4.2. NanoOrange[®] Protein quantification Kit

Principe

Ce kit permet de détecter des concentrations en protéines beaucoup plus faibles, jusqu'à 10 ng/ml, ce qui est 100 fois plus sensible que les méthodes de Bradford ou Lowry. Lorsque le réactif NanoOrange se fixe au détergent hydrophobe "coaté" autour des protéines à doser, il devient fluorescent (spectre d'absorption centré sur 470 nm et spectre d'émission centré sur 570 nm) ce qui permet la quantification de l'échantillon par mesure de la fluorescence à l'aide d'un spectrofluorimètre.

Matériel

- ?? NanoOrange Kit(N-666, Molecular probes).
 - NanoOrange protein quantification "reagent" [500x] (stocké à -20°C et protégé de la lumière).
 - NanoOrange protein quantification "diluent"[10x] (stocké à température ambiante).
 - Bovine serum Albumine (BSA) standard (stocké à -20°C).
- ?? Spectrofluorimètre AMINCO-Bowman série2.

Protocole

1. Préparer du "diluent"[1x] sachant que 2,5 ml sont nécessaires par échantillon à doser.
2. Préparer la "working solution" : diluer 500x le "reagent" dans le "diluent" [1x], bien homogénéiser et protéger

l'ensemble de la lumière.

3. Préparer la gamme étalon de 0.01 µg/ml à 0.6 µg/ml de BSA diluée dans la "working solution" en suivant les proportions suivantes :

Volume(µl) de solution BSA	Volume de working solution [1x]	Concentration finale en BSA
0 ml	2,50 ml	0 µg/ml
1,50 ml de 1µg/ml	1,00 ml	0,6 µg/ml
0,75 ml de 1µg/ml	1,75 ml	0,3 µg/ml
0,25 ml de 1µg/ml	2,25 ml	0,1 µg/ml
1,50 ml de 0,1µg/ml	1,00 ml	0,06 µg/ml
0,75 ml de 0,1µg/ml	1,75 ml	0,03 µg/ml
0,25 ml de 0,1µg/ml	2,25 ml	0,01 µg/ml

4. Prélever 100 µl de chacun des échantillons à doser.
5. Ajouter 2,4 ml de "working solution" sur les 100 µl d'échantillon, vortexer et faire chauffer 10 minutes entre 90 et 96°C en protégeant de la lumière.
6. Laisser revenir à température ambiante pendant 20 minutes, en protégeant de la lumière.
7. Pour la mesure, exciter la solution à 485 nm et mesurer l'émission à 590 nm à l'aide d'un spectrofluorimètre.
8. Déterminer la concentration en protéines de l'échantillon à partir de la droite de régression obtenue.

RESULTATS ET DISCUSSION

IV Résultats et discussion

Dans le but de pouvoir déterminer l'implication de la sucrose synthase (SuSy) et de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) dans l'allocation du carbone chez la chicorée, nous avons donc entrepris la mise en évidence de ces enzymes dans différents organes de ce végétal. Utilisant les outils disponibles au laboratoire, à savoir des polysérums dirigés respectivement contre des formes recombinantes de SuSy et d'AGPase, nous avons mis au point une technique d'immunomarquage en fluorescence de ces protéines immobilisées sur une membrane après Western Blot. Cette technique a ensuite été appliquée à la détection de SuSy et d'AGPase dans des préparations protéiques de chicorée.

Dans une première partie, nous discuterons de la production et de la purification de nos deux protéines cibles, la SuSy et l'AGPase recombinantes qui serviront de témoins positifs au cours des différentes étapes de notre recherche. Une deuxième partie sera consacrée à la mise au point, à l'aide des SuSy et AGPase recombinantes, d'une technique de détection en immunofluorescence de ces protéines immobilisées sur une membrane, ainsi qu'à la vérification du bon fonctionnement de cette méthode pour l'analyse d'extraits protéiques de radis utilisés comme contrôle végétal. Une troisième et dernière partie traitera de l'application de notre méthode à la mise en évidence de la SuSy et de l'AGPase dans des extraits protéiques de chicorée.

1. Production et purification de SuSy et d'AGPase

1.1. Vérification de l'expression des protéines recombinantes en bactéries

Afin de réaliser notre premier objectif, nous devons disposer de stocks suffisants de protéines recombinantes. Pour constituer ceux-ci, nous avons donc entrepris de remettre en culture des bactéries BL21DE3 transformées avec les vecteurs pET 17b-SuSy et pET 21c-AGPase conservées à -80°C . Le vecteur pET 17b-SuSy contient en effet une séquence complète codant pour le gène SUS1 d'*Arabidopsis* tandis que le vecteur pET 21c-AGPase contient une séquence partielle de la petite sous-unité d'AGPase d'*Arabidopsis* (ApS). Ces constructions ont été générées au laboratoire dans le cadre d'un projet de recherche. Ces séquences étaient alors destinées à l'expression des protéines en bactéries, ces dernières étant utilisées pour l'immunisation de lapins. Il existait donc déjà, au laboratoire, des stocks de polysérums contre ces deux protéines cibles. Les protéines exprimées par les bactéries BL21DE3 transformées avec ces vecteurs sont en fait des protéines de fusion qui possèdent un T7-tag à leur extrémité NH_2 terminale. Leur poids moléculaire attendu, calculé sur base de leur séquence en acides aminés est de 95 kDa pour la SuSy et de 27 kDa pour l'AGPase.

Afin de contrôler la bonne production de la SuSy et de l'AGPase, des cultures de 5 ml de milieu sélectif ont été ensemencées avec des colonies bactériennes transformées soit avec le vecteur pET17b-SuSy soit avec le pET21c-AGPase. L'IPTG a permis d'induire l'expression des protéines par les bactéries, et des cultures non induites ont été utilisées comme contrôle.

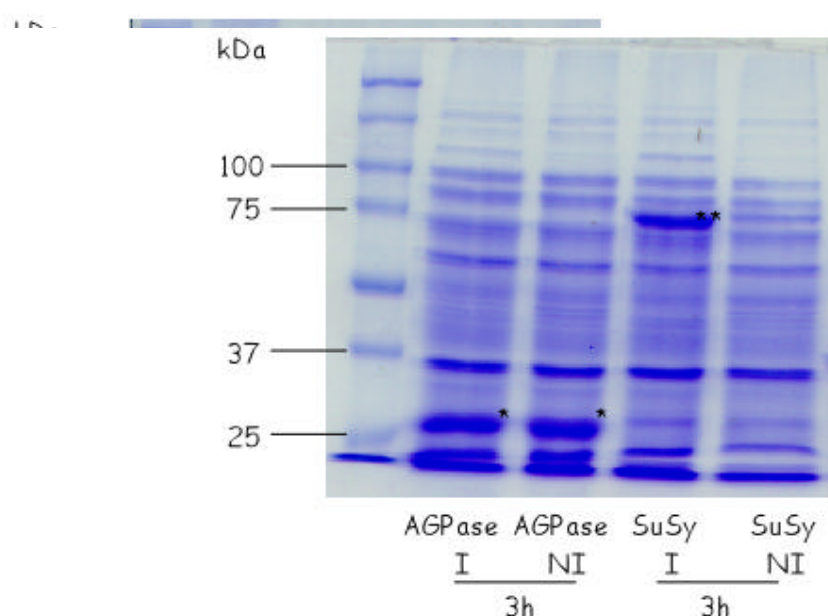
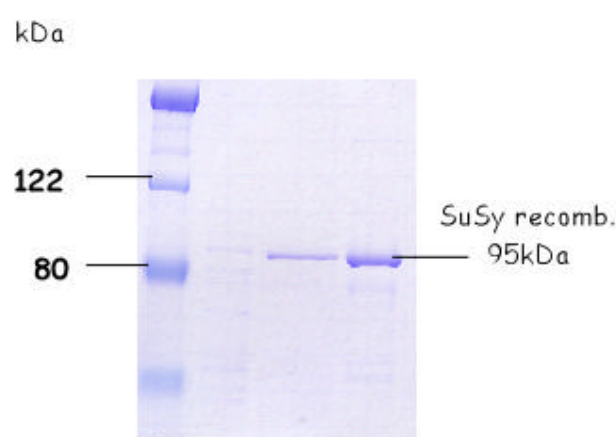


Figure 26 A : Induction de l'expression de la Sucrose synthase (SuSy) et l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) en *E. coli*. Analyse en gel SDS-PAGE 8% après coloration au bleu de coomassie des protéines totales extraites au départ de bactéries BL21DE3 contenant les vecteurs pET17b-SuSy ou pET21c-AGPase cultivées en présence (I) ou en absence (NI) d'IPTG durant 3h

* bande attendue pour l'AGP : 27 kDa

** bande attendue pour la SS : 95 kDa



SuSy recomb.

Figure 26 B : Vérification du poids moléculaire de la SuSy recombinante à l'aide d'un autre étalon de poids moléculaire - Bio-Rad, 161-0318 - (cfr Matériel et Méthodes). Analyse sur gel SDS-PAGE 8% après coloration au bleu de coomassie de 10 μ l d'échantillons de SuSy recombinantes

L'analyse, sur gel SDS-PAGE, des extraits protéiques totaux préparés à partir de ces cultures, a permis de vérifier l'efficacité de la production des protéines par les bactéries. La figure 26 A montre que les protéines d'intérêt, d'un poids moléculaire de 95 kDa pour la SuSy (**) et 27 kDa pour l'AGPase (*), sont effectivement produites par les bactéries BL21DE3 en présence d'IPTG. Aucune distinction entre la production des cultures induites et non-induites n'est cependant visible dans le cas de l'AGPase recombinante, contrairement à la SuSy recombinante pour laquelle une nette différence est observée. Ces résultats ne surprennent pas vraiment dans la mesure où ils ont déjà été obtenus au laboratoire : le contrôle basal d'expression des protéines n'est pas toujours effectif dans le cas du vecteur pET. Cette déficience dans le contrôle de l'expression des protéines cibles n'est toutefois pas gênante dans le cadre de notre travail puisque notre but était de constituer des stocks suffisants de protéines cibles recombinantes dont nous avons ensuite entrepris la purification. La figure 26 B constitue une vérification du PM de la SuSy qui est mise en évidence entre les étalons de 80 et 122 kDa conformément à ce qui est attendu d'après son PM théorique de 95 kDa.

1.2. Purification des protéines recombinantes

Afin de purifier les protéines recombinantes, nous avons eu recours à la chromatographie d'affinité, à l'aide d'un kit "T7 tag purification" (Novagen). Ce kit est basé sur l'interaction d'anticorps anti-T7 tag, fixés sur une résine de chromatographie, avec le peptide T7 tag des protéines recombinantes.

Sachant que les deux protéines recombinantes SuSy-T7tag et AGPase-T7tag sont en réalité produites par les bactéries sous forme de corps d'inclusion insolubles, nous avons dû recourir à l'utilisation d'un protocole d'extraction permettant la solubilisation de ces protéines. Cette opération a été réalisée par l'ajout d'urée 6M au tampon d'extraction. Une telle concentration d'urée étant néfaste pour la colonne d'affinité, cette concentration en urée a ensuite été ramenée à 2M en diluant l'extrait avec du tampon de chargement. Cette opération peut, dans certains cas, provoquer la précipitation des protéines solubilisées. C'est ce que nous avons observé dans le cas de l'AGPase.

La figure 27 montre l'analyse sur gel SDS-PAGE en conditions dénaturantes de l'AGPase recombinante purifiée par précipitation. Elle atteste bien de l'efficacité de cette procédure qui donne lieu à une préparation d'AGPase recombinante débarrassée de protéines de *E.coli*. Contrairement à l'AGPase, la SuSy recombinante n'a pas précipité lors de l'étape de dilution de l'urée de 6 à 2M. Les protéines extraites, diluées dans le tampon binding 2M urée, ont ensuite été déposées sur la colonne de chromatographie afin de purifier la SuSy. L'utilisation de cette colonne d'affinité T7-tag a permis d'obtenir plusieurs éluats qui ont été analysés sur gel SDS-PAGE en condition dénaturante. La figure 28 montre que la SuSy recombinante est bien présente dans les éluats 1 et 2. Elle ne l'était qu'en très faible quantité dans les éluats 3, 4 et 5 (à peine visible sur gel et non montré).

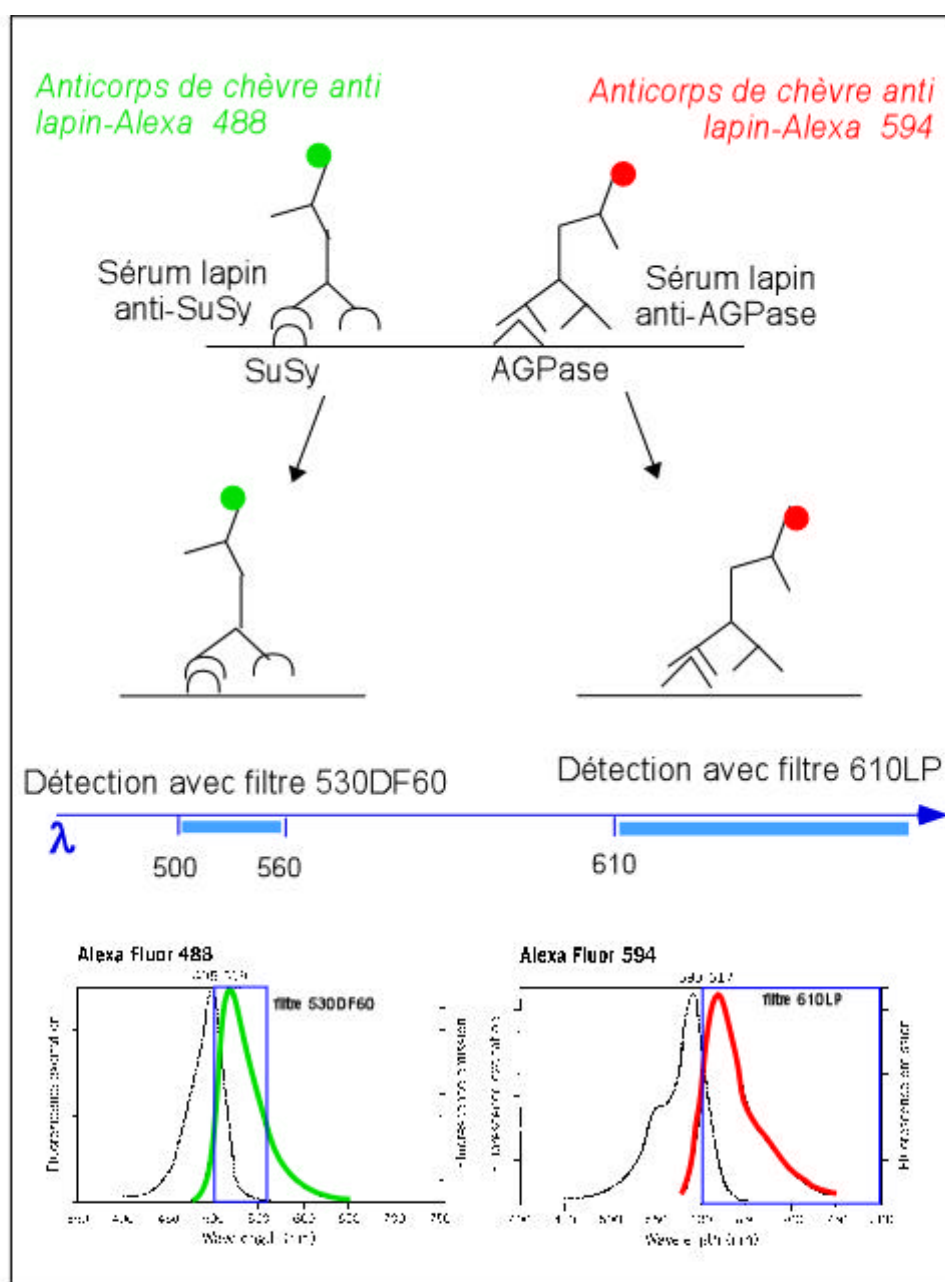


Figure 29: Test d'immunodétection indirecte.

Ce test utilise des anticorps primaires anti-protéines cibles et les anticorps secondaires couplés aux fluorochromes Alexa 488 (vert) et Alexa 594 (rouge). L'utilisation de filtres permet la mise en évidence des fluorochromes en sélectionnant leur longueur d'onde d'émission (filtre 530DF60 pour la SuSy et 610 LP pour l'AGPase (les filtres sont représentés par les rectangles bleus)

Les protéines présentes dans les échantillons contenant de l'AGPase et de la SuSy purifiées ont été quantifiées à l'aide d'un kit de dosage basé sur la fluorescence : le « NanoOrange quantification kit » (Molecular Probes), la méthode de Bradford n'ayant pas permis de doser les éluats contenant la SuSy.

Les stocks d'AGPase et de SuSy que nous avons ainsi constitués contenaient respectivement 3.7 mg/ml et 86 µg/ml (éluat 1) et 55 µg/ml (éluat 2) de protéines. Ces stocks nous ont ensuite permis de vérifier la spécificité des polysérums anti-SuSy et anti-AGPase disponibles au laboratoire. Ils ont aussi servi à mettre au point notre technique de marquage en fluorescence comme explicité ci-après.

2. Mise au point de la technique de marquage

2.1. Principe du marquage et de la détection

Le système de détection que nous avons utilisé est basé sur la technique d'immunomarquage indirect. L'antigène, immobilisé sur un support solide (membrane PVDF), est reconnu par des anticorps primaires spécifiques (produits chez le lapin). Ceux-ci sont, eux-mêmes, reconnus par des anticorps secondaires (anticorps de chèvre anti-IgG de lapin) couplés à des fluorochromes dont la fluorescence, émise suite à l'excitation, est détectée à l'aide d'un Fluorimager grâce à l'utilisation de filtres appropriés (Figure 29).

Notre choix des fluorochromes couplés aux anticorps secondaires a été effectué selon deux critères principaux:

- (a) La nécessité de discriminer les fluorescences émises, puisque le but final est de pouvoir appliquer notre détection en multiplex : afin de mettre en évidence les protéines sans avoir de détection chevauchante des fluorochromes, il faut choisir des fluorochromes dont les spectres d'émission sont bien distincts.
- (b) La disponibilité, au niveau du Fluorimager, des filtres de sélection des longueurs d'ondes d'émission permettant de distinguer les différents fluorochromes entre eux.

Sur base de ces données, les fluorochromes Alexa 488 et Alexa 594 (Molecular Probes) ont été retenus. Alexa 488 émettant à 519 nm (vert), est visualisé grâce au filtre 530DF60 qui sélectionne les longueurs d'onde d'émission comprises entre 500 et 560 nm. Alexa 594 qui émet à 617 nm (rouge), est quant à lui détecté grâce à un filtre 610LP permettant de laisser passer les longueurs d'ondes émises au-delà de 610 nm (Figure 29). Tout au long de nos expérimentations, nous avons systématiquement utilisé, d'une part, l'anticorps secondaire couplé à Alexa 488 pour la détection de la SuSy et d'autre part, l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 594 pour mettre en évidence l'AGPase.

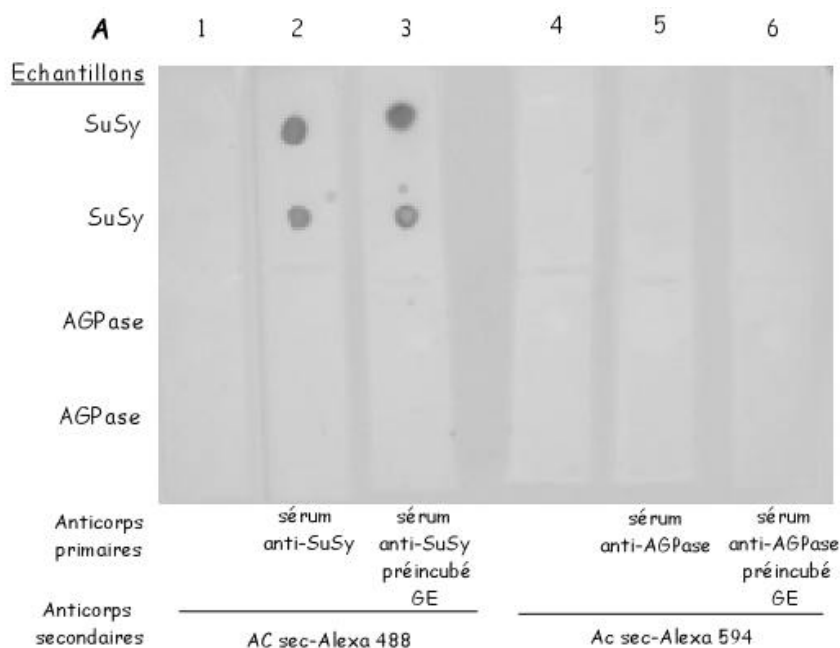


Figure 30 A : Dot-blot. Visualisation à l'aide du filtre 530DF60 de la SuSy et de l'AGPase recombinantes immunomarquées avec les anticorps primaires anti-SuSy épuisés (3) et non épuisés (2); les anticorps primaires anti-AGPase épuisés (6) et non épuisés (5) et les anticorps secondaires respectifs : Ac sec-Alexa 488 (1, 2, 3) et Ac sec-Alexa 594 (4, 5, 6)

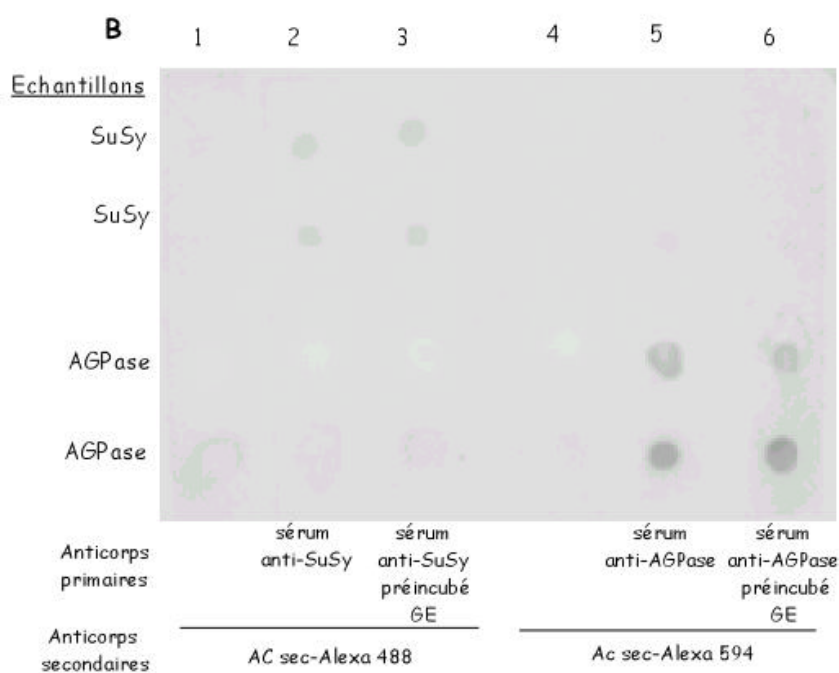


Figure 30 B : Dot-blot. Visualisation à l'aide du filtre 610LP de la SuSy et de l'AGPase recombinantes immunomarquées avec les anticorps primaires anti-SuSy épuisés (3) et non épuisés (2); les anticorps primaires anti-AGPase épuisés (6) et non épuisés (5) et les anticorps secondaires respectifs : Ac sec-Alexa 488 (1, 2, 3) et Ac sec-Alexa 594 (4, 5, 6)

2.2. Détection en DOT-BLOT

L'évaluation de la méthode de détection a tout d'abord été réalisée en dot-blot. Nous avons ainsi entrepris un test de réaction croisée dans le double but de vérifier d'une part, la spécificité des anticorps primaires et d'autre part, la possibilité de détecter chacune des deux protéines à l'exclusion de l'autre.

Nous avons également inclus dans ce test un contrôle d'épuisement qui vise à détecter la proportion d'anticorps anti-T7 Tag dans les polysérums spécifiques utilisés. En effet, les protéines recombinantes SuSy-T7 Tag et AGPase-T7 Tag ont servi à immuniser les lapins : il est donc possible que les polysérums produits par ces derniers contiennent des anticorps anti-T7 Tag et que ceux-ci soient la source de détections croisées (un même sérum serait capable de reconnaître les deux protéines, SuSy-T7 Tag et AGPase-T7 Tag, à la fois).

Dans la pratique, 2 µl de SuSy et d'AGPase recombinantes ont été déposés sur des languettes de membrane PVDF. Après une étape de saturation, chacune de ces languettes a ensuite été incubée, soit en présence de sérum anti-AGPase ou de sérum anti-SuSy, soit en présence des mêmes sérums épuisés par pré-incubation avec une autre protéine, la glucose épimérase fusionnée à un T7 Tag (GE-T7 Tag), soit encore en présence des anticorps secondaires seuls. Comme nous l'avons dit précédemment, la fixation des anticorps anti-SuSy a été visualisée par l'utilisation des anticorps secondaires-Alexa 488 tandis que la fixation des anticorps anti-AGPase a été détectée grâce aux anticorps secondaires-Alexa 594.

La figure 30 A montre les membranes marquées et analysées à l'aide du Fluorimager, en utilisant le filtre 530DF60 prévu pour la visualisation du fluorochrome Alexa 488. Nous pouvons constater que le sérum anti-SuSy montre une très bonne reconnaissance des deux échantillons de SuSy déposés sur la membrane tandis qu'aucun échantillon d'AGPase n'est significativement détecté (strip 2). Nous en avons donc déduit, d'une part, que la SuSy ne possède pas d'épitope commun avec l'AGPase (ce qui est conforme à ce que nous attendions puisque nous n'avons pas observé de réelle homologie entre les séquences de la SuSy et de l'AGPase) et d'autre part, que le polysérum anti-SuSy ne contient pas de quantités importantes d'anticorps anti-T7tag. Cette dernière déduction peut d'ailleurs être vérifiée par l'analyse de la membrane marquée avec le sérum anti-SuSy pré-incubé en présence de GE-T7tag et sur laquelle aucune diminution significative de la reconnaissance de la SuSy n'est observée (strip 3). L'absence de marquage sur la membrane mise en contact avec l'anticorps secondaire seul (strip 1) témoigne bien de la spécificité de notre procédure de marquage. Aucune protéine n'est mise en évidence sur les languettes soumises à une procédure de marquage impliquant l'utilisation des anticorps secondaires-Alexa 594 (strips 4, 5, 6), ce qui atteste de la spécificité de notre méthode de détection de la SuSy.

Les résultats de l'analyse au Fluorimager des mêmes membranes marquées, en utilisant le filtre 610LP pour la mise en évidence du fluorochrome Alexa 594, sont présentés à la figure 30 B. Nous pouvons observer que le sérum anti-AGPase détecte correctement les deux échantillons d'AGPase déposés sur les membranes alors qu'aucune reconnaissance significative des échantillons de SuSy ne peut être mise en évidence (strip 5). Nous

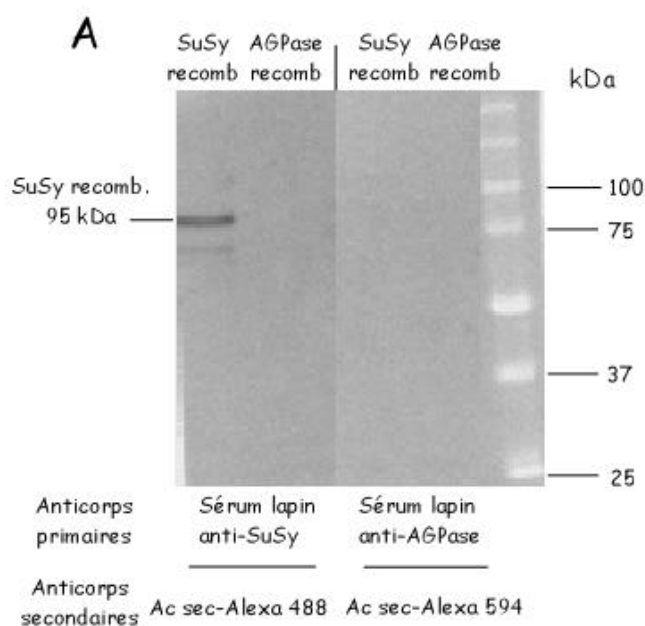


Figure 31 A : Western-blot. Visualisation à l'aide du filtre 530DF60 de la SuSy (550 ng) et de l'AGPase (3,7 μ g) recombinantes immunomarquées avec les anticorps primaires anti-SuSy et les anticorps primaires anti-AGPase et les anticorps secondaires respectifs : Ac-sec-Alexa 488 et Ac-sec-Alexa 594
Temps d'excitation: 2,9 secondes. Filtre: 530DF60.

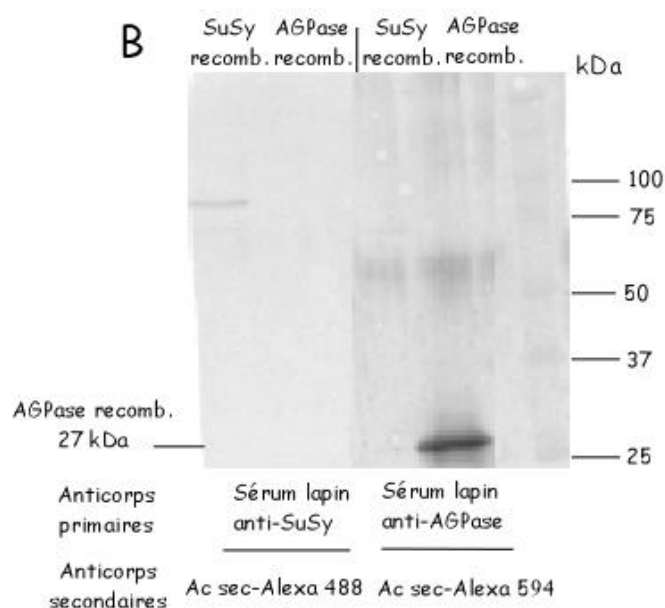


Figure 31 B : Western-blot. Visualisation à l'aide du filtre 610LP de la SuSy (550 ng) et de l'AGPase (3,7 μ g) recombinantes immunomarquées avec les anticorps primaires anti-SuSy et les anticorps primaires anti-AGPase et les anticorps secondaires respectifs : Ac-sec-Alexa 488 et Ac-sec-Alexa 594.
Temps d'excitation: 2,9 secondes. Filtre: 610LP.

pouvons donc déduire, comme dans le cas de la SuSy, que le polysérum anti-AGPase ne possède pas de quantité importante d'anticorps anti-T7tag, ce qui peut aussi être vérifié sur la membrane marquée avec le sérum pré-incubé avec la GE-T7tag qui ne présente pas de diminution significative du marquage de l'AGPase (strip 6). En outre, l'absence de marquage sur la membrane incubée avec l'anticorps secondaire Alexa 594 seul (strip 4) atteste bien de la spécificité de notre procédure de marquage. En conséquence, la présence d'un faible signal au niveau des échantillons de SuSy (figure 30 B, strips 2 et 3) ne serait pas due à des interactions non spécifiques anticorps-antigène mais plutôt aux caractéristiques du filtre utilisé pour la mise en évidence de l'anticorps secondaire Alexa 594. En effet, en permettant la visualisation de la fluorescence émise à partir de 610 nm, ce filtre permet également la visualisation d'un faible signal encore émis par le fluorochrome Alexa 488 au-delà de 610 nm.

2.3. Détection en WESTERN-BLOT

Notre méthode de détection a ensuite été évaluée en Western Blot : après migration en gel SDS-PAGE, des échantillons de SuSy et d'AGPase recombinantes ont été transférés sur une membrane de PVDF et marqués avec les sérums anti-SuSy et anti-AGPase. La figure 31 montre les résultats obtenus suite à l'examen au Fluorimager des membranes marquées avec le filtre 530DF60, pour la mise en évidence de la SuSy (figure 31 A) et avec le filtre 610 LP, pour la détection de l'AGPase (figure 31 B).

La figure 31 A confirme bien ce que nous avons obtenu lors du dot-blot puisque seule la SuSy recombinante est détectée par le sérum anti-SuSy au PM attendu de 95 kDa. L'AGPase n'est pas reconnue par le sérum anti-SuSy et aucune protéine n'est détectée sur la membrane marquée avec le sérum anti-AGPase et les anticorps secondaires-Alexa 594. Ceci permet donc de conclure que nos méthodes de détection et de visualisation de SuSy sont bien spécifiques. De la même manière, l'utilisation du filtre 610LP permet la mise en évidence de la reconnaissance de l'AGPase par le sérum anti-AGPase au PM attendu de 27 kDa (figure 31 B). Aucune détection de SuSy n'est visible sur la membrane incubée avec l'anticorps primaire anti-AGPase et les anticorps secondaires Alexa 594, ce qui atteste une fois de plus de la spécificité du sérum utilisé. Le léger signal encore détecté au niveau de la SuSy serait, comme dans le cas des dot blots, dû au filtre (610LP) utilisé pour la mise en évidence des anticorps secondaires-Alexa 594 qui laisserait passer une partie du signal émis par le fluorochrome Alexa 488. Rappelons ici que, lors de l'analyse des membranes marquées au Fluorimager, l'excitation des fluorochromes est réalisée par épi-illumination, en scannant une large gamme de longueurs d'ondes dans l'ultra-violet. Les fluorochromes différents présents sur une même membrane sont donc tous excités simultanément, d'où l'utilité de filtres de détection spécifiques de chacun d'eux. Le filtre 610 LP que nous utilisons pour la mise en évidence du fluorochrome Alexa 594 est donc moins optimal que le filtre 530DF60 servant à la mise en évidence du fluorochrome Alexa 488. Il permet toutefois une discrimination suffisante des deux marquages (SuSy-Alexa 488 et AGPase-Alexa 594) et c'est pourquoi nous avons continué à l'utiliser tout au long de ce travail.

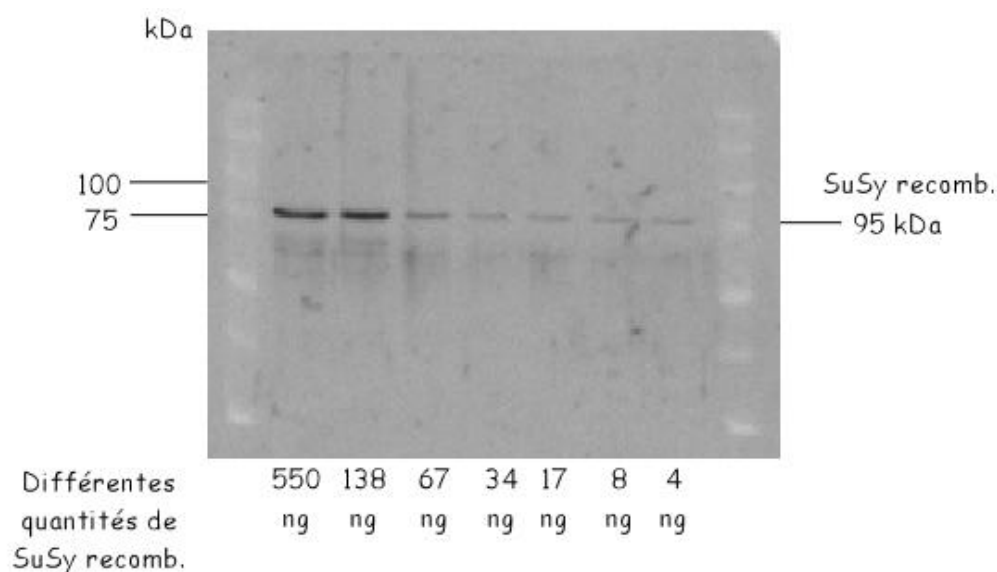


Figure 32 : Western-blot. Immunodétection de différentes quantités de SuSy recombinante analysées en Western-blot et marquées à l'aide du polysérum anti-SuSy et de l'anticorps secondaire-Alexa 488. Temps d'excitation : 2,9 secondes. Filtre: 530DF60.

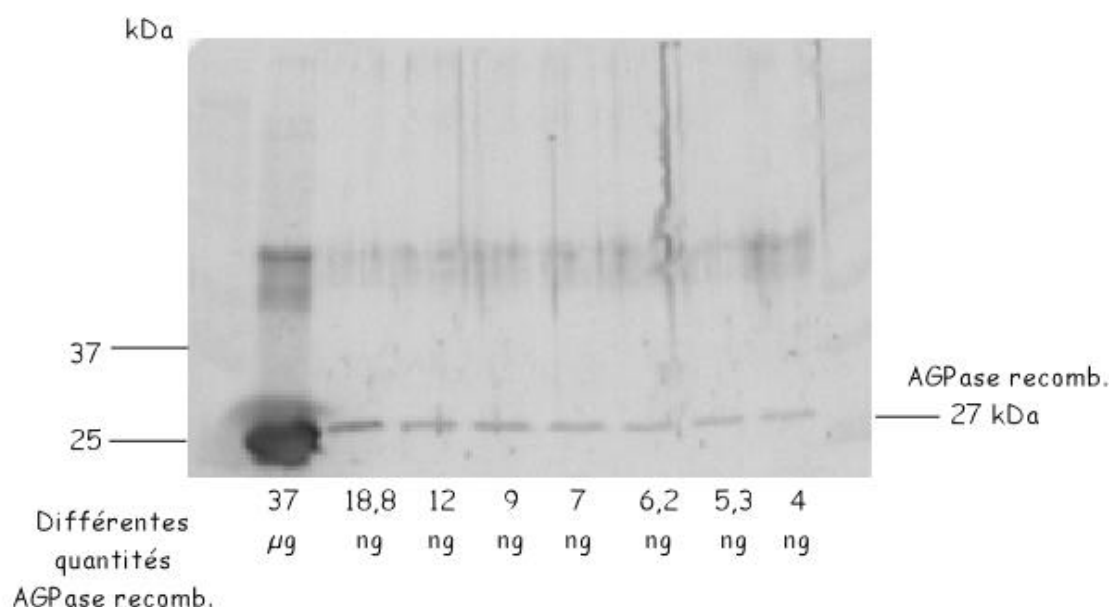


Figure 33 : Western-blot. Immunodétection de différentes quantités d'AGPase analysées en Western-blot et marquées à l'aide du polysérum anti-AGPase et de l'anticorps secondaire-Alexa 594. Temps d'excitation : 2,9 secondes. Filtre: 610LP.

La membrane présentée figure 31 A a été gardée à l'obscurité et relue toutes les semaines sans montrer la moindre diminution d'intensité de signal durant une période de deux mois, ce qui confirme la stabilité de ce marquage en immunofluorescence qui est nettement supérieure à celle d'un marquage en chimioluminescence d'une durée de demi-vie de 60 min. Après avoir vérifié la spécificité des polysérums qui mettent bien en évidence des protéines d'un poids moléculaire attendu et la fonctionnalité de notre méthode de détection, nous avons entrepris d'en évaluer la sensibilité.

2.4. La sensibilité de la méthode de détection

Afin de vérifier la limite de détection des protéines recombinantes par les polysérums, différentes quantités de SuSy et d'AGPase recombinantes ont été déposées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane et marquées avec leurs polysérums et anticorps secondaires respectifs.

Les résultats obtenus (Figures 32 et 33) montrent que la SuSy est bien détectée jusqu'à 4 ng, tout comme l'AGPase. Cette sensibilité est comparable à celle obtenue en travaillant en chimioluminescence et chimifluorescence (Fluorescence imaging technical manual Amersham Pharmacia Biotech, p132). Le marquage diffus qui peut être observé aux alentours de 50 kDa (figure 33) pourrait résulter de la détection d'agrégats d'AGPase, formés lors du stockage des protéines recombinantes et mal dénaturés lors du gel SDS-PAGE.

Mise au point d'une technique de détection de la SuSy et de l'AGPase recombinante : premières conclusions

A ce stade de notre travail, nous pouvons conclure que nous avons mis au point un test de détection spécifique de la SuSy et de l'AGPase recombinantes en fluorescence. Cette approche permet la détection d'au moins 4 ng de protéines recombinantes, ce qui correspond à la gamme de sensibilité des techniques ECF et ECL couramment utilisées en protéomique.

Dans l'étape suivante de notre démarche, nous avons entrepris d'évaluer la validité de notre méthode pour la détection des protéines cibles dans des extraits végétaux.

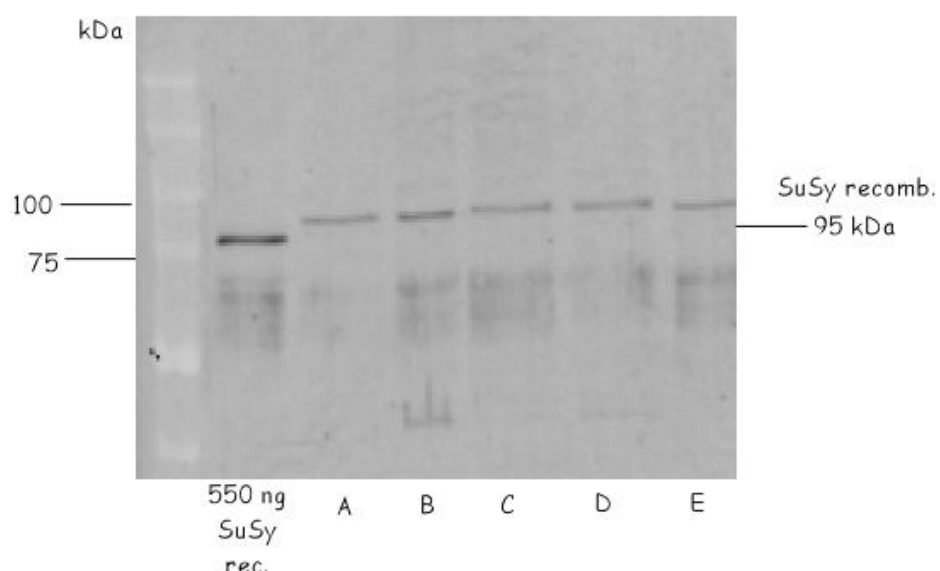


Figure 34 : Western-blot. Immunodétection de la SuSy dans 10 μ g d'extraits protéiques bruts de feuilles de radis préparés par l'intermédiaire des tampons suivants : (A) Mops ; (B) Mops + IP ; (C) Hepes ; (D) Hepes + IP ; (E) Rivard, analysés en Western-blot et marqués à l'aide du polysérum anti-SuSy et de l'anticorps secondaire-Alexa 488.

Contrôle positif : 550 ng de SuSy recombinante

Temps d'excitation : 2,9 secondes. Filtre: 530DF60.

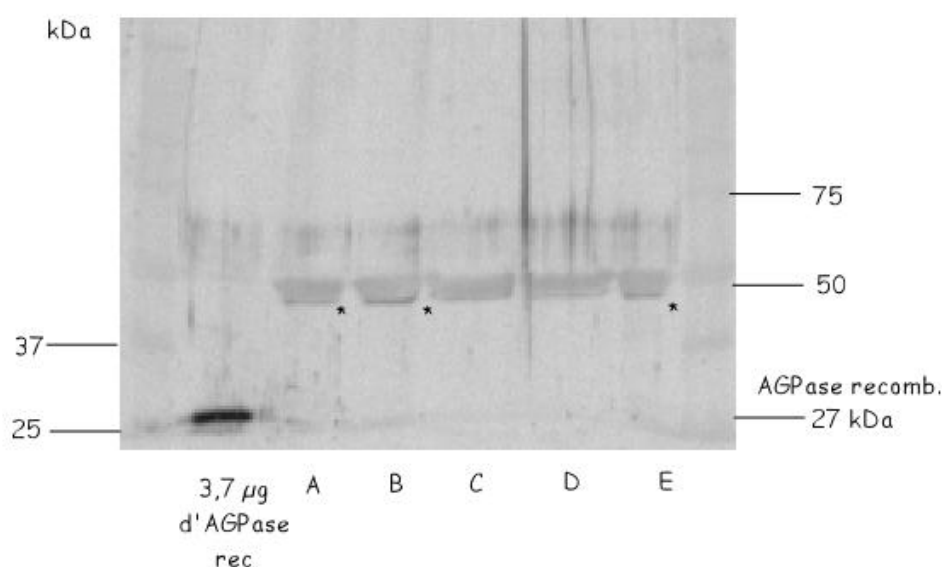


Figure 35 : Western-blot. Immunodétection de l'AGPase dans 10 μ g d'extraits protéiques bruts de feuilles de radis préparés par l'intermédiaire des tampons suivants : (A) Mops ; (B) Mops + IP ; (C) Hepes ; (D) Hepes + IP ; (E) Rivard, analysés en Western-blot et marqués à l'aide du polysérum anti-AGPase et de l'anticorps secondaire-Alexa 594.

Contrôle positif : 3,7 μ g d'AGPase recombinante

Temps d'excitation : 2,9 secondes. Filtre: 610LP

3. Mise au point de la détection de SuSy et d'AGPase dans des extraits de protéines végétales

3.1. Détection de la SuSy et de l'AGPase dans des extraits de protéines de radis

Les sérums utilisés dans cette recherche étant dirigés contre une SuSy et une AGPase (Aps partielle) d'*Arabidopsis* produites sous forme recombinante, nous avons tout d'abord évalué leur capacité à reconnaître leurs protéines cibles dans des extraits protéiques solubles de feuilles de radis (*Raphanus sativus*). Les tampons d'extraction que nous avons utilisés ne permettent pas l'extraction des protéines membranaires, mais uniquement les protéines solubles, puisque les enzymes que nous recherchons sont essentiellement cytosoliques. Comme *Arabidopsis*, le radis appartient à la famille des crucifères. Il est toutefois nettement plus approprié pour une étude biochimique qu'*Arabidopsis* qui requiert quant à elle un grand nombre de plants pour réunir le matériel de base nécessaire aux extractions.

Nous avons extrait les protéines solubles de feuilles de radis de 2 semaines avec cinq tampons différents, dérivés de la littérature. Les extraits obtenus ont été analysés sur gel SDS-PAGE et leur contenu en protéines a été estimé par la méthode de Bradford. Nous avons ainsi obtenu les rendements suivants en protéines solubles : Tampon Mops : 0,450 mg/ml ; Tampon Mops + IP (inhibiteurs de protéases) : 0,549 mg/ml ; Hepes : 0,478 mg/ml ; Hepes + IP : 0,529 mg/ml ; Rivard : 0,529 mg/ml. Les extractions à l'aide de ces différents tampons ont donc, d'un point de vue rendement, fonctionné de manière presque semblable, même si le tampon Mops+IP donne lieu au rendement le plus élevé.

Au départ de ces extraits, nous avons entrepris une immunodétection de SuSy et d'AGPase après une électrophorèse SDS-PAGE et un transfert sur membrane PVDF. La figure 34 montre, dans tous les extraits analysés, la détection par les anticorps anti-SuSy d'une protéine de PM légèrement supérieure à la taille de la SuSy recombinante contrôle (95 kDa). Ce résultat concorde avec ceux obtenus par Usada et ses collaborateurs (1999) qui ont détecté de la SuSy dans des extraits de protéines solubles de feuilles de radis grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre une SuSy de soja. Ils ont en effet mis en évidence une bande de poids moléculaire se situant légèrement en dessous des 97 kDa. Des résultats similaires ont aussi été obtenus sur des extraits de protéines solubles de fruit de tomate et de grains de riz grâce respectivement à l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'isoforme SuS1 de maïs et les isoformes SuS 1, 2, 3 du riz (Wang *et al*, 1999).

Le polysérum anti-AGPase, dirigé contre une séquence partielle d'ApS, détecte pour sa part deux protéines de poids moléculaire proche de 50 kDa : 1 bande (*) visible dans les extraits Mops, Mops + IP, Rivard ; et une bande de poids moléculaire supérieure plus épaisse et marquée de manière plus diffuse, visible dans tous les extraits (Figure 35). Ces protéines pourraient correspondre à la petite (ApS) et à la grande (ApL) sous-unité

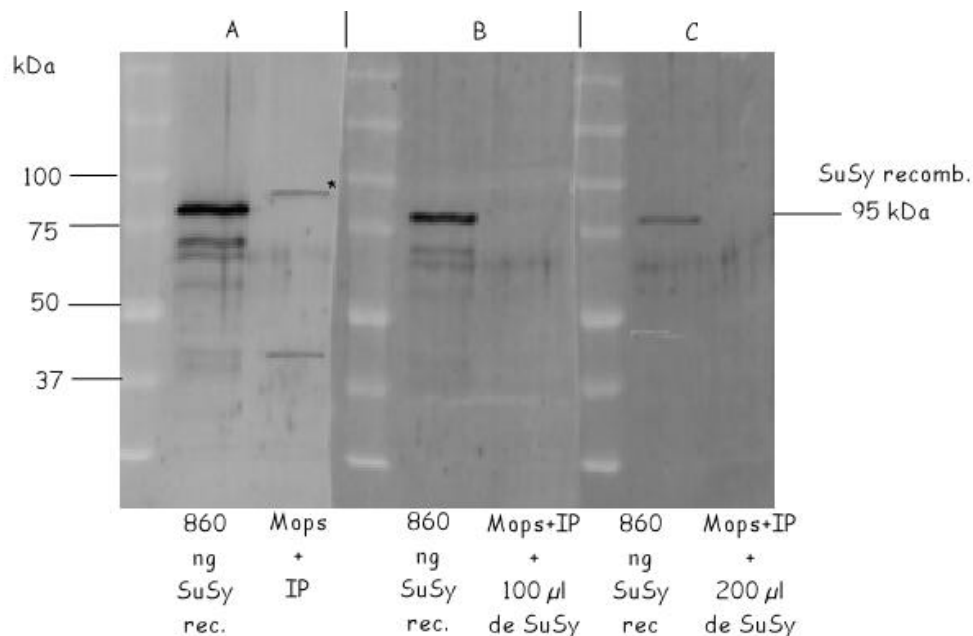


Figure 36 : Western-blot. Immunodétection de la SuSy dans 10 µg de protéines solubles de feuilles de radis extraites avec du tampon Mops + IP ; analysées en Western-blot et marquées à l'aide du polysérum anti-SuSy non épuisé (A) et épuisé avec 100 µl (B) et 200 µl (C) d'une préparation de SuSy recombinante purifiée. Anticorps secondaire Alexa 488.

Contrôle positif : 860 ng de SuSy recombinante

Temps d'excitation : 2,9 secondes. Filtre : 530DF60.

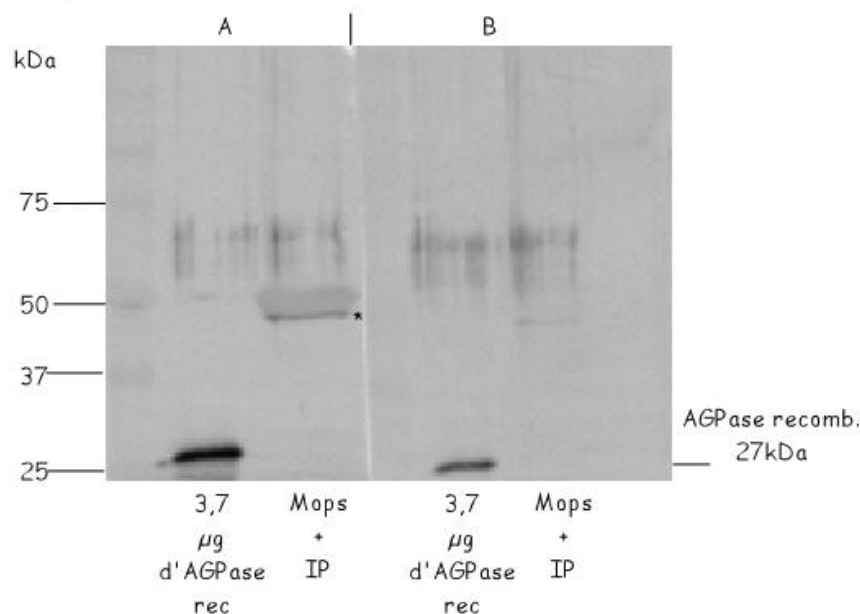


Figure 37 : Western-blot. Immunodétection de l'AGPase dans 10 µg de protéines solubles de feuilles de radis extraites avec du tampon Mops + IP ; analysés en Western-blot et marqués à l'aide du polysérum anti-AGPase non épuisé (A) et épuisé avec 0,299 mg d'AGPase recombinante purifiée (B). Anticorps secondaire : Ac sec-Alexa 594.

Contrôle positif : 3,7 µg d'AGPase recombinante.

Temps d'excitation : 2,9 secondes. Filtre : 610LP.

d'AGPase dont les poids moléculaires sont respectivement de 49 et 52 kDa dans des extraits de protéines solubles de feuilles d'*Arabidopsis* (Way *et al.*, 1998), de 50 kDa pour la petite et 51 kDa pour la grande sous-unité de l'AGPase de tubercules pommes de terre (Ballicora *et al.*, 1998), et en général de 50 et 56 kDa pour la petite et la grande sous-unité de l'AGPase d'endosperme des céréales (Krishnan *et al.*, 1998).

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'effet d'une étape de pré-incubation du sérum anti-AGPase en présence d'AGPase recombinante, sur la reconnaissance des protéines cibles dans les extraits végétaux. Une disparition de la réponse observée dans les extraits végétaux confirmerait l'identité des protéines détectées. Un test semblable a été effectué en parallèle avec le sérum anti-SuSy pré-incubé en présence de SuSy recombinante. Nous avons alors choisi de travailler uniquement avec l'extrait Mops+IP, qui s'avère être une des meilleures préparations permettant la détection des deux protéines cibles.

La figure 36 présente les résultats obtenus à la suite de la pré-incubation des anticorps anti-SuSy en présence d'un échantillon de SuSy recombinante purifiée. A ce stade, nous précisons que le stock de SuSy recombinante que nous avons purifié dans le cadre de ce travail était apparemment trop peu concentré pour avoir un effet significatif sur la réponse du polysérum (résultats non montrés). Cela étant, nous avons dû utiliser un stock plus ancien de SuSy purifiée mélangée à du tampon de chargement contenant du bleu de bromophénol, ce qui a rendu impossible le dosage de la quantité de protéines présentes dans notre échantillon. Nous avons cependant pu constater que, comme précédemment, le sérum anti-SuSy non épuisé détecte une protéine de PM légèrement supérieur à la SuSy recombinante contrôle (Figure 36 A, *). Une autre protéine de PM compris entre 50 et 37 kDa est également détectée. Ce résultat qui diffère de celui présenté figure 31 a été observé à plusieurs reprises mais de manière non constante. Aucune réaction de ce genre n'a malheureusement été recensée dans la littérature couverte. Nous avons donc formulé l'hypothèse que cette protéine de faible PM pourrait correspondre à de la SuSy partiellement dégradée. La pré-incubation du sérum en présence de SuSy recombinante semble bien corroborer cette hypothèse, puisque cette protéine de faible PM, de même que celle de PM attendu, ne sont pas détectées dans les extraits en conditions d'inhibition (Figure 36 B et C). La reconnaissance de la protéine recombinante par le sérum diminue avec la quantité croissante de protéines recombinantes servant à l'épuisement, sans toutefois arriver à éteindre complètement le signal.

La figure 37 montre quant à elle les résultats obtenus suite à la pré-incubation du sérum anti-AGPase avec 299 µg d'AGPase recombinante purifiée. Les deux bandes protéiques d'un PM proche de ~50 kDa sont peu (bande inférieure) ou pratiquement pas (bande supérieure) reconnues par le polysérum épuisé (Figure 37, B) alors qu'elles sont bien détectées par le sérum non épuisé (Figure 37, A). La pré-incubation du sérum avec l'AGPase recombinante ne parvient toutefois pas à éteindre complètement le signal observé sur les protéines recombinantes (Figure 37 B), ce qui tend à indiquer que le rapport anticorps- antigènes inhibiteurs n'était pas optimal pour obtenir une inhibition totale.

Ces résultats suggèrent donc que les deux protéines détectées par le sérum anti-AGPase dans des extraits de

feuilles de radis correspondent aux deux sous-unités contribuant à la formation de la structure tetramérique de l'AGPase souvent détectées aux alentours de 50 kDa (Doan *et al.*, 1999). Ajoutons qu'aucun marquage direct des protéines recombinantes végétales n'a été observé avec les anticorps secondaires seuls, ce qui confirme une fois de plus la spécificité de nos résultats (non montré).

Nous mentionnerons enfin que nous avons pu observer la présence de « bandes parasites » entre les marqueurs de 75 kDa et 50 kDa à la fois dans les extraits végétaux et dans les échantillons d'AGPase recombinantes (Figure 37). Différentes hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cet artefact, en procédant par éliminations successives : (i) puisque aucune bande similaire n'a été observée sur la membrane contrôle incubée avec les anticorps secondaires, ce marquage n'est donc pas dû à ces derniers ; (ii) ce n'est pas de l'autofluorescence puisque l'exposition d'une membrane après transfert des protéines, mais avant marquage, ne montre aucune mise en évidence de ces bandes (non montré) ; (iii) il ne s'agit pas non plus d'AGPase agrégée puisque les bandes sont toujours présentes sur les membranes incubées avec les anticorps épuisés avec de l'AGPase. Il est toutefois curieux de constater qu'une observation similaire a été décrite par Wang et ses collaborateurs lors du marquage de Western blots avec un polysérum dirigé contre la petite sous-unité d'AGPase d'*Arabidopsis* produite sous forme recombinante (Wang *et al.* 1998). Ces auteurs proposent que ce marquage « parasite » serait dû à la présence, dans le polysérum anti-AGPase d'anticorps reconnaissant un épitope commun à plusieurs protéines (présentes tant dans les extraits végétaux que recombinants). Des protéines provenant de *E.coli*, présentes en faible quantité dans les échantillons servant aux immunisations, seraient à la base de la formation de ces anticorps. Ces derniers pourraient alors se fixer à des protéines végétales possédant des sites antigéniques semblables.

Ajoutons pour terminer qu'un essai de réduction de ces interactions non spécifiques par diminution du temps d'incubation de l'anticorps primaire (de une nuit à 4 °C à 1h à température ambiante) s'est traduit par une nette diminution de l'intensité de ces bandes mais aussi par une diminution des signaux positifs, ce qui nous a conduit à garder nos conditions initiales de travail.

Les tests d'inhibition nous ont donc principalement confirmé la validité de notre approche pour la mise en évidence de SuSy et d'AGPase dans des extraits végétaux. Nous avons ensuite entrepris d'appliquer ce test à la détection de la SuSy et l'AGPase dans différents extraits protéiques d'organes (racines, feuilles) de chicorée.

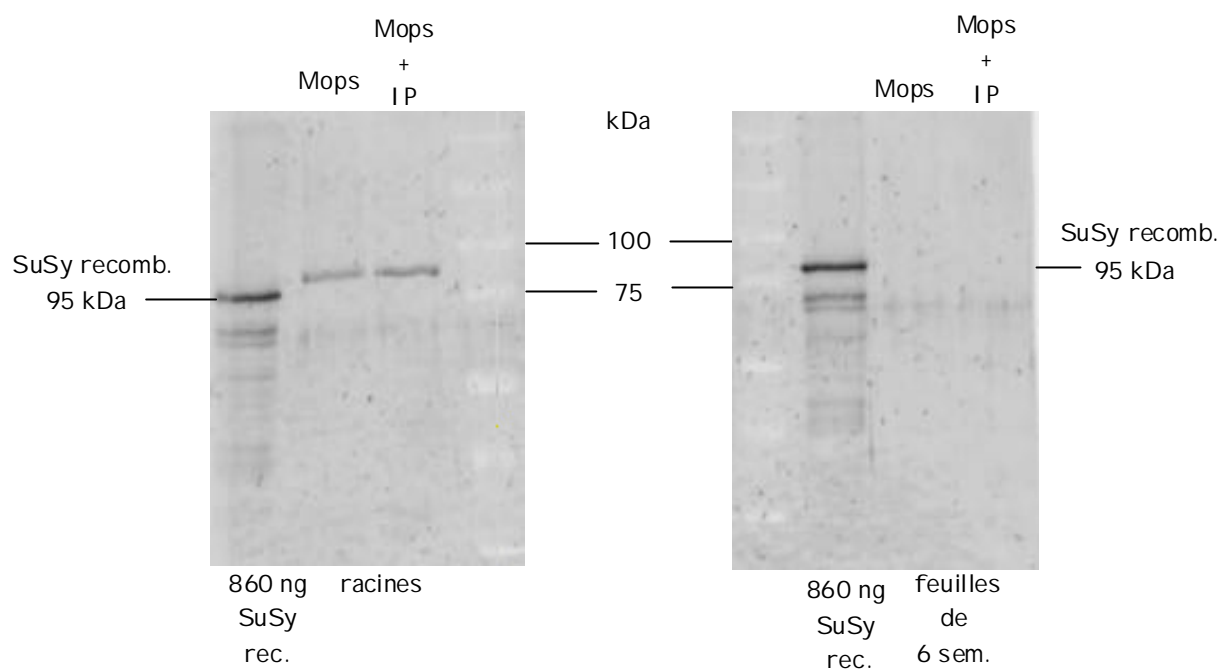


Figure 38 : Western-blot. Immunodétection de la SuSy dans 10 μ g de protéines solubles extraites avec les tampons Mops et Mops+IP de racines et de feuilles de chicorées de 6 semaines analysés en Western-blot et marqués à l'aide du polysérum anti-SuSy et de l'anticorps secondaire-Alexa 488.
 Contrôle positif : 860 ng de SuSy recombinante.
 Temps d'excitation : 2,9 secondes. Filtre: 530DF60.

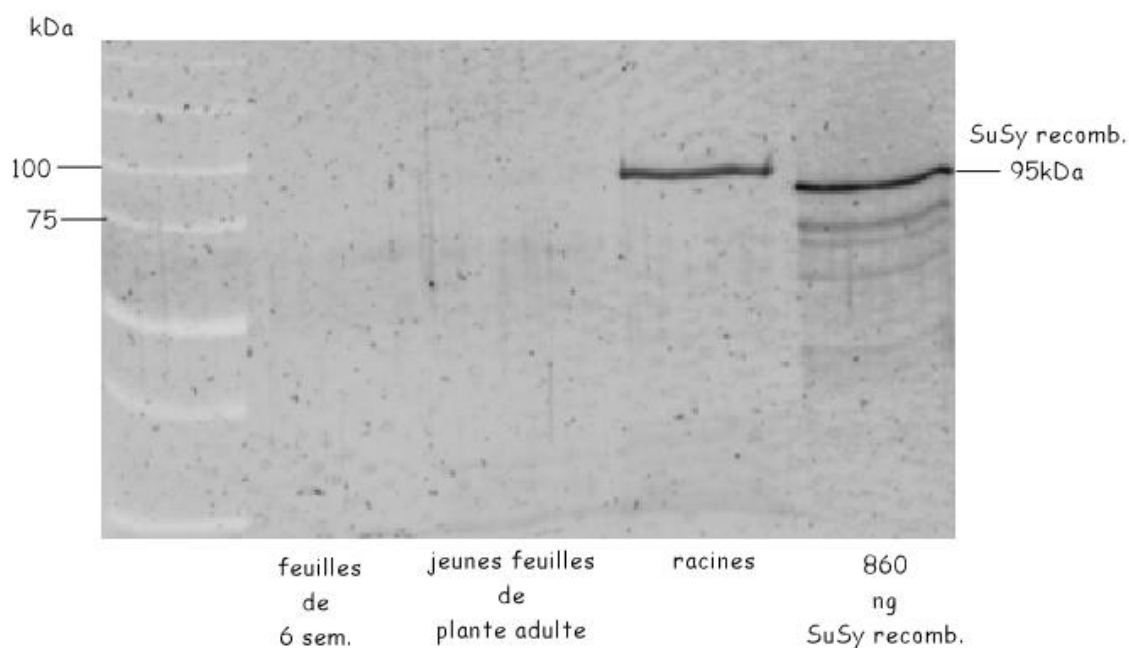


Figure 39 : Western-blot. Immunodétection de la SuSy dans 50 μ g d'extraits protéiques solubles de chicorée analysés en Western-blot et marqués à l'aide du polysérum anti-SuSy et de l'anticorps secondaire-Alexa 488. Contrôle positif : 860ng de SuSy recombinante. Temps d'excitation : 2,9 secondes. Filtre: 530DF60.

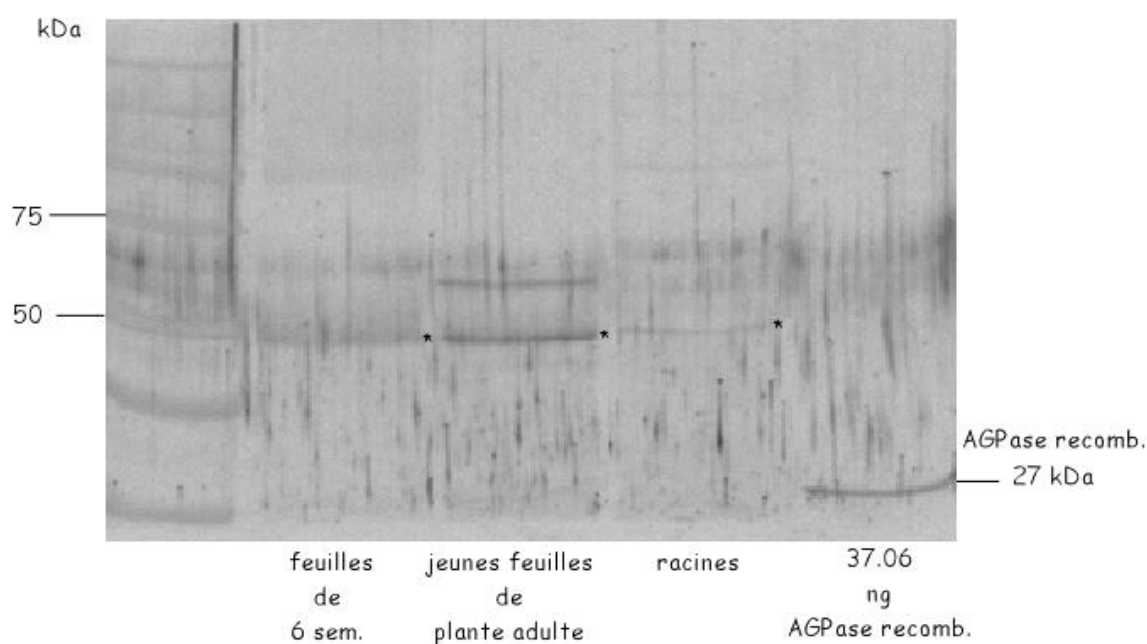


Figure 40 : Western-blot. Immunodétection de l'AGPase dans 50 μ g d'extraits protéiques solubles de chicorée analysés en Western-blot et marqués à l'aide du polysérum anti-AGPase et de l'anticorps secondaire-Alexa 594. Contrôle positif : 37,06 ng d'AGPase recombinante. Temps d'excitation : 2,9 secondes. Filtre: 610LP.

3.2. Détection de la SuSy et de l'AGPase dans des extraits de protéines de chicorée

Nous avons tout d'abord réalisé des extractions de protéines solubles avec les tampons Mops et Mops+IP à partir, d'une part, de feuilles de chicorée provenant de plantules de 6 semaines et de jeunes feuilles provenant de plantes matures et, d'autre part, de racines. Après avoir quantifié les protéines totales des différents extraits, nous avons analysé ces derniers en Western blot et avons marqué les blots avec les sérums anti-SuSy et anti-AGPase.

La figure 38 montre que le sérum anti-SuSy détecte, dans 10 µg d'extraits bruts de racine, une protéine d'un PM légèrement supérieur à celui de la SuSy recombinante, similaire à celle que nous avons déjà observée dans les marquages de protéines de feuilles de radis. Cette bande correspondrait donc bien à de la SuSy, présente dans la racine de chicorée. Aucune mise en évidence de la SuSy n'a par contre été obtenue dans les extraits de feuilles de chicorée. Nous avons donc refait l'expérience en analysant 50 µg de protéines solubles (Krishnan *et al.*, 1986) au lieu de 10 µg. Comme le montre la figure 39, malgré l'augmentation de la quantité de protéines solubles déposées, aucune détection d'une protéine pouvant correspondre à la SuSy n'est visible dans les extraits de feuilles de chicorée. Par contre, ce résultat confirme bien la présence de SuSy dans les racines. La protéine mise en évidence semble toujours être la même puisqu'elle est détectée au même PM que lors de l'analyse effectuée sur 10 µg de protéines solubles.

La figure 40 montre les résultats relatifs à la mise en évidence d'AGPase dans 50 µg de protéines totales extraites de feuilles et de racines de chicorée. Une bande protéique de PM proche de 50kDa est bien visible dans les extraits préparés à partir de jeunes feuilles de plantes adultes (*) et une même bande, d'intensité plus faible, est aussi distinguée dans les extraits de racines et de feuilles de 6 semaines. Le marquage d'une bande de PM supérieur est également observé dans les extraits provenant de jeunes feuilles de chicorées matures. Comme évoqué précédemment dans le cas du radis, les protéines mises en évidence aux alentours d'un PM de 50 kDa correspondraient à la sous-unité de l'AGPase. La bande de PM plus élevé reconnue par le polysérum anti-AGPase dans les extraits provenant des jeunes feuilles de plantes adultes pourrait correspondre à la grande sous-unité de l'AGPase puisque la littérature renseigne l'existence de PM allant jusqu'à 60kDa pour cette sous-unité (Harn *et al.*, 2000). Les nombreuses traînées verticales présentes peuvent être dues à de nombreux composés qui peuvent venir « parasiter » la détection en fluorescence (Fluorescence imaging technical manual Amersham Pharmacia Biotech p 101).

Conclusion générale concernant la détection de la SuSy et de l'AGPase dans les extraits végétaux

Au terme du travail que nous venons de présenter, nous pouvons conclure que nous avons réussi à mettre au point une technique d'immunomarquage en fluorescence nous permettant de mettre en évidence les deux enzymes cibles de notre étude, la SuSy et l'AGPase, dans des extraits végétaux aussi bien de radis que de chicorée analysés en Western blots. Comme précisé dans l'introduction, la SuSy est principalement impliquée dans l'utilisation du saccharose par les organes consommateurs et la synthèse des polysaccharides pariétaux. L'AGPase a, quant à elle, un rôle central dans le métabolisme de l'amidon. Leur détection nous permet donc de cerner leur implication dans le métabolisme carboné de la chicorée. Rappelons que nous avons mis en évidence de la SuSy dans des extraits de protéines solubles de racines de chicorée, mais pas dans les extraits provenant de feuilles, tant pour des dépôts de 10 µg que de 50 µg de protéines totales. L'AGPase a pour sa part été détectée dans tous les dépôts de 50µg de ces extraits de racines et de feuilles. Malheureusement, nous n'avons pas trouvé de confirmation de nos résultats relatifs à la chicorée dans la littérature et nous devons donc, dans un premier temps, et dans l'état actuel de la recherche, nous limiter à émettre des hypothèses quant au détail du métabolisme du carbone dans la chicorée. Ces hypothèses sont présentées dans le chapitre suivant.

DISCUSSION GENERALE

V Discussion générale

Comme nous l'avons décrit dans notre introduction, le métabolisme des végétaux dépend d'un apport constant de carbone réduit utilisé pour la synthèse des polysaccharides, des protéines et des acides nucléiques. La sucrose synthase (SuSy) et l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) sont deux enzymes clés impliquées respectivement dans le métabolisme du saccharose et la synthèse d'amidon. La SuSy joue un rôle primordial dans l'utilisation du saccharose par les organes consommateurs (racines et jeunes feuilles). Plus précisément elle catalyse la réaction de dégradation du saccharose pour former de l'UDP-glucose et du fructose. L'UDP-glucose est ensuite utilisé comme précurseur dans la synthèse des polysaccharides pariétaux et de réserve, alors que le fructose peut être utilisé dans d'autres voies biochimiques comme la respiration mitochondriale. L'AGPase, quant à elle, est l'enzyme clé de la synthèse d'amidon. Elle catalyse la transformation de glucose-1-phosphate et d'ATP en ADP-glucose, précurseur utilisé pour la synthèse d'amidon. Cette synthèse se fait soit dans les chloroplastes où est synthétisé l'amidon transitoire soit dans les amyloplastes où se déroule la synthèse d'amidon de réserve.

La localisation de ces deux enzymes pourrait contribuer à la connaissance de la distribution du carbone à travers la plante. A l'heure actuelle, on ignore pratiquement tout de l'intervention de la SuSy et de l'AGPase dans le métabolisme des glucides de certains végétaux tels la chicorée qui présente la particularité de stocker non pas de l'amidon, ni du saccharose mais des polyfructanes (inuline) comme polysaccharides de réserve. L'objectif de notre travail a été de vérifier la présence ou l'absence de SuSy et d'AGPase dans différents tissus de la chicorée de manière à établir l'implication de la SuSy et de l'AGPase dans l'allocation du carbone chez ce végétal.

Des polysérums dirigés respectivement contre des formes recombinantes de SuSy et d'AGPase d'*Arabidopsis thaliana* ont été utilisés pour la détection des protéines analogues présentes dans des extraits protéiques de chicorée analysés en Western blot. Nous avons pour ce faire mis au point une procédure de marquage des blots en immunofluorescence : la fixation des anticorps primaires anti-SuSy et anti-AGPase est révélée par l'utilisation d'anticorps secondaires couplés respectivement aux fluorochromes Alexa 488 et Alexa 594 visualisés par l'utilisation de filtres spécifiques de la longueur d'onde d'émission de chacun des fluorochromes.

Des stocks de SuSy et d'AGPase recombinantes ont été constitués et ont permis de vérifier la spécificité des deux polysérums contre leurs protéines recombinantes respectives, ainsi que le bon fonctionnement de la détection en fluorescence. Nous avons appliqué notre technique d'immunodétection de la SuSy et de l'AGPase à des extraits de protéines solubles de radis -pour les différentes mises au point- et ensuite de chicorée. Différentes bandes d'un poids moléculaire attendu (pour la SuSy légèrement supérieure à ~95 kDa et pour l'AGPase très proche 50 kDa) ont été détectées dans les extraits de protéines solubles de jeunes feuilles de radis (2 semaines). Des protéines d'un PM similaire ont été détectées dans des extraits protéiques solubles de chicorée. De plus, nos résultats ont permis de mettre en évidence des différences de distribution de SuSy et

d'AGPase chez différents organes de ce végétal : la SuSy est uniquement détectée dans les racines mais pas dans les feuilles tandis que l'AGPase est présente en quantité appréciable dans les feuilles et en quantité plus limitée dans les racines. Sur base de ces résultats nous formulons dans ce qui va suivre des hypothèses quant aux rôles possibles de ces enzymes dans le métabolisme des glucides chez la chicorée.

1. Rôles de la SuSy dans le métabolisme des glucides chez la chicorée : Hypothèses

Cas des feuilles de chicorée

Nous avons n'avons pas détecté de la SuSy dans les extraits de protéines solubles préparés à partir des feuilles de chicorée, alors que nous en avons bien mis en évidence dans les feuilles de radis. Ce résultat, à première vue paradoxal, peut être expliqué de la manière suivante : dans le cas du radis nous avons travaillé sur des plantules de deux semaines. Or, Wang et ses collaborateurs (1999) ont montré qu'à ce stade de développement, l'activité de la SuSy atteint un plateau maximum. Des résultats d'immunodétection, réalisés sur des extraits de protéines solubles durant cette période d'activité maximum, montrent une forte présence de SuSy cytosolique (Wang et al, 1999). Notre détection de SuSy dans les extraits protéiques solubles de radis est donc bien en accord avec les découvertes préalablement faites sur ce végétal. La SuSy jouerait donc, durant cette période son rôle de fournisseur d'UDP-glucose à la synthèse de polysaccharides pariétaux.

Contrairement au radis, nous ne détectons pas de SuSy dans les jeunes feuilles de chicorée aussi bien de plantules de 6 semaines (42 jours) que de plantes matures. Ces données sont en accord avec des tests d'activité réalisés par Druart et ses collaborateurs (2001) sur les invertases et la SuSy de feuilles de chicorée durant une période de 63 jours de développement de plantules suite à la germination. L'activité des invertases membranaires et vacuolaires durant cette période est très importante (échelle d'activité allant de 0 à 600) tandis que les invertases et la SuSy cytosoliques ne manifestent respectivement que peu ou pas d'activité significative (échelle d'activité allant de 0 à 6) au cours des 63 jours de développement étudiés. Il semble donc que, durant le début du développement des feuilles de chicorée, les invertases acides fournissent le substrat nécessaire au métabolisme.

Toutefois, notre travail et les études présentées ci-dessus (études d'activités et de détection) ont toujours été réalisées avec des extraits protéiques solubles et non pas membranaires, nous empêchant ainsi de détecter toute protéine éventuellement associée au complexe membranaire de synthèse de cellulose. En effet, nous avons vu dans l'introduction qu'il existe deux modèles expliquant le rôle de la SuSy dans la synthèse de cellulose : le premier est basé sur une SuSy cytosolique, tandis que le second implique une SuSy liée à la membrane plasmique et qui fournirait directement l'UDP-glucose nécessaire pour la synthèse de cellulose (Salnikov *et al.*, 2001). Nous sommes donc peut-être en présence des deux modèles, l'un opérant chez le radis

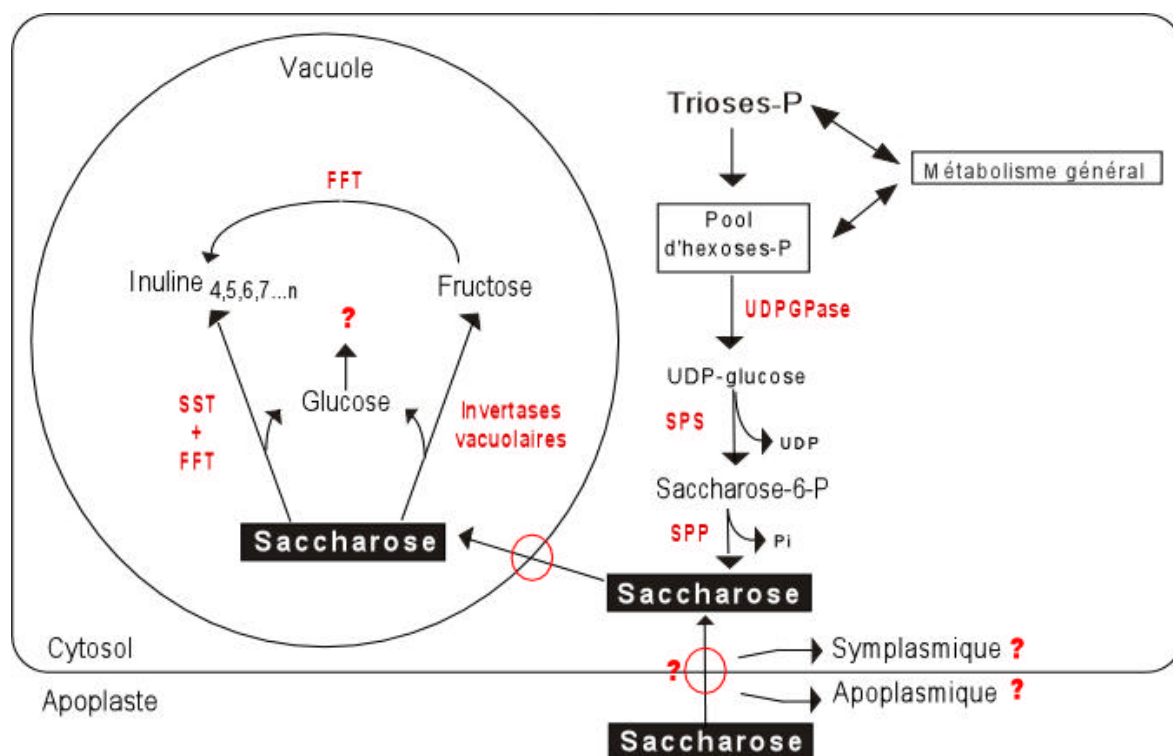


Figure 41 : Hypothèse actuelle de la synthèse d'inuline chez la chicorée
Légende de la figure voir texte.

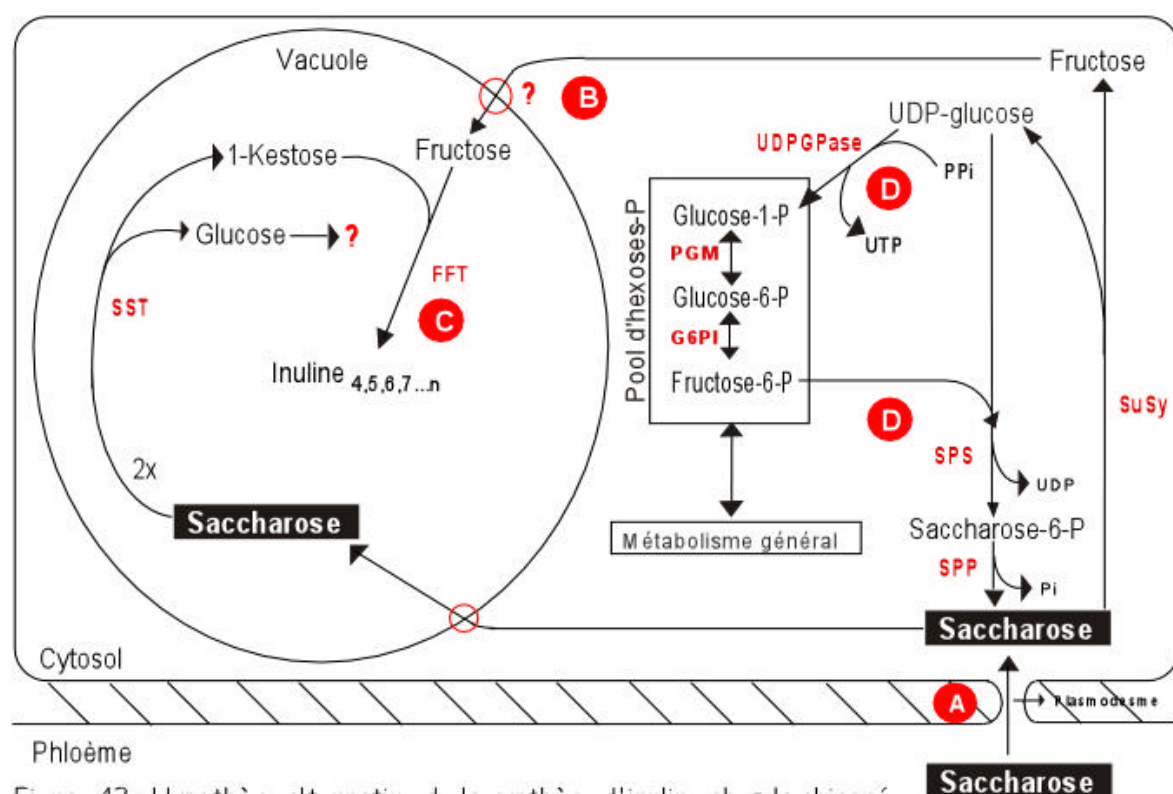


Figure 42 : Hypothèse alternative de la synthèse d'inuline chez la chicorée
Légende de la figure voir texte

et l'autre chez la chicorée. En effet, la détection de SuSy chez le radis laisserait à penser que ce serait une SuSy cytosolique qui fournirait l'UDP-glucose à la synthèse de cellulose. Dans le cas de la chicorée, le fait que l'on ne détecte pas de SuSy dans les feuilles impliquerait que la synthèse de cellulose s'y déroulerait peut-être grâce l'intervention d'une SuSy membranaire.

Cas de la racine de chicorée

La forte détection de la SuSy dans les extraits de protéines solubles de racine de chicorée est en accord avec l'augmentation de l'activité de la SuSy observée dans les racines de chicorée à partir du 53^{ème} jour après la germination (Druart *et al.*, 2001). Rappelons que cette étude d'activité a été effectuée sur une période de 63 jours de développement de plantules suite à la germination et que, pour notre travail, nous avons utilisé des racines bien plus âgées, ce qui suggère que la présence de SuSy est maintenue tout au long de la phase de croissance et de maturation de la racine de chicorée.

La présence de SuSy dans la racine de chicorée nous conduit à émettre différentes hypothèses concernant son rôle à cet endroit. Premièrement, la SuSy pourrait alimenter les voies de synthèse des polysaccharides pariétaux (cellulose, hemicellulose, pectines) en UDP-glucose. On sait en effet que ces polysaccharides insolubles constituent 20% de la pulpe de la racine de chicorée. Deuxièmement, la SuSy pourrait avoir un rôle dans la synthèse de l'inuline. En effet, Il a été démontré que dans les tubercules de pommes de terre, la SuSy utilise le saccharose pour fournir de l'UDP-glucose à la synthèse d'amidon (Nakai *et al.*, 1999). Dans le cas de la chicorée, le saccharose est utilisé pour synthétiser l'inuline. Il est donc possible que la SuSy fournisse aussi une partie du substrat nécessaire à cette même synthèse.

La figure 41 illustre le modèle actuel concernant la voie de synthèse de l'inuline dans la racine de chicorée, voie qui n'implique pas la SuSy. Ce modèle montre qu'une partie de l'UDP-glucose synthétisé dans le cytosol grâce à l'intervention de l'UDP-glucose pyrophosphorylase peut être transformée en saccharose par l'intermédiaire de la sucrose phosphate synthase (SPS) et de la sucrose phosphate phosphatase (SPP). Un deuxième apport de saccharose peut se faire via le transport phloémien dont le déchargement (symplastique ou apoplasrique ?) dans la racine de chicorée à ce stade de développement n'est pas encore éclairci. Le saccharose peut ensuite entrer dans la vacuole grâce à l'intervention de transporteurs spécifiques. Ensuite, il peut soit être utilisé pour la synthèse d'inuline, soit clivé en fructose et glucose par l'intermédiaire des invertases vacuolaires (Vijn et Smeekens, 1999). Le fructose, on le sait depuis peu, peut être directement utilisé par la FFT pour allonger les chaînes d'inuline (Van Den Ende *et al.*, 2002). Dans ce modèle, la SST et la FFT utilisent une grande quantité de saccharose pour la synthèse d'inuline. Elles libèrent donc une grande quantité de glucose dont on ne connaît pas l'utilisation au niveau vacuolaire.

La détection de SuSy dans l'extrait de racine de chicorée nous a amenés à émettre une hypothèse selon laquelle la SuSy fournirait directement le substrat à la synthèse d'inuline, selon le modèle suivant (Figure 42, A) : le saccharose entrerait dans la cellule par la voie symplasmique (plasmodesmes) et la SuSy pourrait alors le dégrader en UDP-glucose et fructose. A partir de là, deux voies, qui fonctionneraient simultanément, sont envisageables. La première fournirait directement à la FFT le fructose destiné à l'allongement des chaînes d'inuline. Pour cela, il faut que le fructose puisse entrer dans la vacuole par l'intermédiaire d'un transporteur (Figure 42, B). Un transporteur permettant l'entrée et la sortie du fructose dans la vacuole a été mis en évidence au niveau du tonoplaste (membrane vacuolaire) de tomate (Nguyen-Quoc et Foyer, 2001). Il n'est donc pas impossible d'en trouver aussi chez la chicorée.

Une telle voie réduirait la concentration en glucose vacuolaire : en effet, deux molécules de saccharose seraient nécessaires à la SST pour la synthèse du précurseur de l'inuline, le 1-kestose. Cette réaction libérerait donc un glucose à chaque synthèse de 1-kestose. La différence par rapport au modèle précédent se situerait au niveau de la FFT qui n'utiliserait plus le saccharose comme substrat de l'allongement des chaînes d'inuline, mais bien le fructose fourni par la SuSy (Figure 42, C). Il y aurait dès lors beaucoup moins de molécules de glucose relâchées dans la vacuole. Un dosage en HPLC de glucose, fructose et saccharose a été effectué sur un broyat de racine de chicorée. Cette analyse a montré un très faible contenu en glucose, alors que les quantités de fructose et de saccharose étaient nettement supérieures (de 20 à 70 fois). Ce résultat préliminaire semble donc confirmer notre hypothèse. Un autre argument en faveur de cette hypothèse réside dans l'impact du fructose sur l'activité de la SuSy. Le fructose peut en effet inhiber la SuSy (Cfr. Introduction). Son fonctionnement dépend donc des mécanismes qui sont capables de prévenir toute accumulation du fructose. Dans notre cas une partie du fructose pourrait entrer dans la vacuole et directement intervenir dans la synthèse d'inuline ou entrer dans d'autres voies de biosynthèse. Ce mécanisme évite une éventuelle accumulation du fructose dans le cytosol et donc une inhibition de la SuSy (Sebkova *et al.*, 1998).

La deuxième voie envisagée dans notre modèle est, comme dans le modèle actuel, celle qui conduit à la formation du saccharose. Cette voie de synthèse utiliserait l'UDP-glucose fourni par la SuSy. Nous savons que l'UDP-glucose peut être transformé en glucose-1-P par l'intermédiaire de l'UDP-glucose pyrophosphorylase. Une fois entré dans le pool d'hexoses phosphates, le glucose-1-P, peut être isomérisé en fructose-6-P (Figure 42, D). Cette molécule pourrait ensuite soit : (a) entrer dans le métabolisme général, (b) être transformée en saccharose-6-P par l'intermédiaire de la SPS et ensuite en saccharose grâce à la SPP. Ce cycle permettrait de réutiliser la partie de l'UDP-glucose qui n'est pas utilisé dans la synthèse des polysaccharides pariétaux.

2. Rôles de l'AGPase dans le métabolisme des glucides chez la chicorée : Hypothèses

La biochimie du métabolisme des fructanes doit être distinguée des réactions de synthèse et de dégradation de l'amidon. En effet, les fructanes sont synthétisés à partir du saccharose par l'action de différentes glycosyles transférases (SST et FFT, cfr introduction) qui n'utilisent pas les sucres diphosphonucléosidiques (ex : ADP-glucose), comme substrats, comme le fait l'AGPase dans la synthèse d'amidon.

La synthèse de fructanes est directement liée à la disponibilité en saccharose et elle peut être ainsi vue comme un second pool de réserve de saccharose avec celui du cytosol. Cette voie de synthèse des fructanes ne doit toutefois pas être considérée comme une voie remplaçant la synthèse d'amidon comme polysaccharide de réserve. Certaines espèces synthétisent de l'amidon et des fructanes avec une prédominance de l'un ou l'autre dans certains organes (feuilles ou racines). La synthèse des fructanes, du saccharose et de l'amidon peut avoir lieu en même temps dans les organes de stockage mais en proportions variées. D'autres espèces montrent des concentrations en amidon tellement faibles qu'elles sont indétectables chimiquement : *Helianthus tuberosus* possède des feuilles contenant une grande quantité d'amidon, peu de saccharose et pas de fructanes alors que ses tubercules accumulent des fructanes sans que l'on puisse y détecter de l'amidon (Pollock, 1986).

Cas des feuilles de chicorée

Tout comme chez le radis, nous avons détecté de l'AGPase dans les extraits de protéines solubles tant de feuilles de chicorée provenant de plantules de six semaines que de jeunes feuilles issues de plantes matures. L'AGPase est toutefois présente en plus faible quantité dans les feuilles provenant de plantules. Il est possible qu'à ce stade de développement, les cellules des feuilles ne contiennent qu'une faible concentration en saccharose puisque le saccharose est utilisé directement dans le métabolisme et que les feuilles ne requièrent pas, à ce moment de constituer des réserves d'énergie (amidon de réserve). Toutefois, la quantité de saccharose présente dans le cytosol peut déclencher la synthèse d'amidon transitoire. Cette énergie sera ensuite réutilisée durant les nuits pour subvenir aux besoins de la plante (cfr introduction).

Une détection plus importante d'AGPase a été mise en évidence dans des jeunes feuilles issues de plantes matures. Ce résultat est peut-être dû au fait que ces feuilles accumulent probablement une plus grande quantité de saccharose dans leurs tissus. En effet, ces feuilles peuvent recevoir, en plus du saccharose qu'elles synthétisent, un apport de saccharose via le phloème au départ des feuilles matures. Ces jeunes feuilles de plantes matures sont à un stade de différenciation plus avancées que les feuilles de plantules de 6 semaines qui leur permet une activité de photosynthèse et donc de synthèse de saccharose plus intense. Une grande quantité de saccharose cytosolique peut activer la voie de synthèse de l'amidon transitoire (comme en période d'activité intense de la photosynthèse). Une synthèse plus importante d'amidon transitoire pourrait donc expliquer la plus

grande quantité d'AGPase détectée à ce stade. Ajoutons à cela que l'expression de l'AGPase est activée en présence d'une forte concentration en saccharose cytosolique. (Coruzzi *et al.*, 2001).

Cas de la racine de chicorée

Nos résultats mettent en évidence la présence d'AGPase dans la racine de chicorée. Une telle détection, même faible, semble paradoxale quand on sait que le principal polysaccharide de réserve de la chicorée n'est pas l'amidon mais l'inuline. Toutefois, il a déjà été prouvé que la coexistence de ces deux métabolismes était possible dans les organes de stockages de certains végétaux tels que l'*Iris foetissima* ou le *Crocus chrysanthus* (Pollock, 1986). Nous n'avons trouvé, dans la littérature parcourue, aucune donnée permettant de confirmer ou d'infirmer la présence d'amidon dans les racines de chicorée. Un test au lugol a cependant été effectué sur une tranche de racine de chicorée et semble aller dans le sens de notre hypothèse, même si ce n'est qu'un résultat préliminaire (non montré). L'amidon de réserve éventuellement présent dans les racines de chicorée pourrait être hydrolysé en hexoses-P et réutilisé dans la synthèse de saccharose qui pourrait alors entrer dans le métabolisme des glucides de la chicorée.

PERSPECTIVES

VI Perspectives

Nos résultats d'immunodétection de SuSy et d'AGPase dans différents tissus de la chicorée nous ont permis de formuler des hypothèses, résumées en Fig. 42, qui devront être validées afin de pouvoir contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes d'allocation du carbone et de leur régulation chez la chicorée. Cette validation nécessitera une étude plus fine des deux enzymes SuSy et AGPase.

1. SuSy

Dans le cas de la SuSy, il faudra dans un premier temps confirmer la présence de l'enzyme dans la racine de chicorée, non seulement par Western-blot, en travaillant au départ d'extraits de protéines solubles et membranaires, mais aussi par localisation *in situ*. Les mêmes techniques devront être appliquées à la détection de SuSy dans les feuilles, de manière à pouvoir vérifier la présence éventuelle de SuSy au niveau de la membrane plasmique, et ainsi de valider notre hypothèse de l'existence, chez la chicorée, d'une SuSy membranaire impliquée dans la synthèse de cellulose.

Dans un second temps, cette approche immunologique devra être complétée par une étude d'activité de la SuSy dans différents organes (racines et feuilles), à différents stades de développement, et par une étude moléculaire. Cette dernière devrait permettre de cloner les gènes correspondant à d'éventuelles isoenzymes de la SuSy. Ces gènes pourraient ensuite être comparés aux séquences connues et être rattachés aux différents groupes de SuSy déjà existants. La découverte d'isoformes permettrait l'étude de leur expression et de leur localisation dans les différents organes de la plante en développement.

Enfin, pour vérifier l'implication éventuelle de la SuSy dans la synthèse d'inuline, il faudrait pouvoir mettre en évidence l'existence de transporteurs de fructose au niveau du tonoplaste de la vacuole, mais surtout le mode de transport du saccharose (symplasmique et/ou apoplasmique) que la racine de chicorée utilise aux différents stades de son développement.

2. AGPase

Il faudra dans un premier temps confirmer la présence de cette enzyme dans la racine de chicorée, par Western-blot et localisation *in situ*. Il faudra également démontrer la présence effective d'amidon dans les racines de chicorée en étudiant les différentes enzymes impliquées dans la voie de synthèse de l'amidon, comme les amidons synthases (GBSS). Dans cette éventualité, il faudra tout d'abord obtenir des anticorps spécifiques de ces enzymes pour ensuite procéder aux mêmes études réalisées lors de ce mémoire, en y ajoutant des détections *in situ*. Si ces recherches devaient s'avérer fructueuses, il faudrait alors les poursuivre au niveau moléculaire en recherchant la présence d'isoformes des différentes sous-unités d'AGPase.

3. Immunodétection

Nous avons, au cours de ce travail, analysé des extraits protéiques après séparation sur électrophorèse à une dimension. Le but ultime de notre approche serait d'arriver à réaliser des immunodétections directes, dites en multiplex, des protéines recherchées, après électrophorèse à deux dimensions et transfert sur membrane. Ce type de détection utiliserait les anticorps primaires spécifiques de la SuSy et de l'AGPase couplés directement à des fluorochromes différents, eux-mêmes visualisés par l'utilisation de filtres appropriés. La combinaison de l'électrophorèse à deux dimensions et du multiplexage permettrait ainsi une détection fine et rapide de la SuSy et de l'AGPase présentes dans un extrait donné. Un premier essai de couplage a déjà été réalisé dans le cadre de ce travail et a montré des résultats fructueux pour les anticorps anti-SuSy (résultats non montrés).

BIBLIOGRAPHIE

VII Bibliographie

Amersham pharmacia biotech (2000) – Technical manual : Fluorescence imaging principles and methods – Amersham pharmacia biotech inc., 1-138.

Appeldoorn N.J.G., Sergeeva L., Vreugenhil D., Plas L., Visser R.G.F. (2002) – In situ analysis of enzymes involved in sucrose to hexose-phosphate conversion during stolon-to-tuber transition of potato – *Physiologia Plantarum*, 115, 303-310.

Asano T., Kunieda N., Omura Y., Ibe H., Kawasaki T., Takano M., Sato M., Furuhashi H., Mujin T., Takaiwa F., Wu C.-Y., Tada Y., Satozawa T., Sakamoto M., Shimada H. (2002) – Rice SPK, a calmodulin-like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development : phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor – *The Plant Cell*, 14, 619-628.

Ballicora M.A., Fu Y., Nesbitt N.M., Preiss J. (1998) – ADP-glucose pyrophosphorylase from potato tubers. Site-directed mutagenesis studies of regulatory sites – *Plant Physiology*, 118, 265-274.

Barratt D.H.P., Barber L., Kruger N.J., Smith A.M., Wang T.L., Martin C. (2001) – Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea – *Plant Physiology*, 127, 655-664.

Black C.C., Mustardy L., Sung S.S., Kormanik P.P., Xu D.P., Pas N. (1987) – Regulation and roles for alternative pathways of hexose metabolism in plants – *Plant Physiology*, 69, 367-394.

Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. (2000) – Biochemistry and molecular biology of plants – American society of plant physiologists edition, 630-669.

Campbell N.A. (1995) – Biologie – édition De Boek université -Wesmael s.a., Bruxelles, 3^{ème} éd., 699-714.

Cardini C.E., Lelopir L.F., Chiriboga J. (1955) – The biosynthesis of sucrose – *J. Biol. Chem.*, 214, 149-155.

Chen B.-Y., Wang Y., Janes H.W. (1998) – ADP-glucose pyrophosphorylase is localised to both the cytoplasm and plastids in developing pericarp of tomato fruit – *Plant Physiology*, 116, 101-106.

Chen Y.-C., Chourey P.S. (1989) – Spatial and temporal expression of the two sucrose synthase genes in maize : immunohistological evidence – *Theor. Appl. Genet.*, 78, 553-559.

Chengappa S., Guilleroux M., Phillips W., Shields R. (1999) – Transgenic tomato plants with decreased sucrose synthase are unaltered in starch and sugar accumulation in the fruit – *Plant Molecular Biology*, 40, 213-221.

Chiou T.-J., Bush D.R. (1998) – Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning – *Plant Biology*, 95, 4784-4788.

Coruzzi G.M., Zhou L. (2001) – Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants : emerging « matrix effects » - *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 247-253.

Delmer D.P., Haigler H. (2002) – The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants – *Metabolic Engineering*, 4, 22-28.

Delmer D.P., Holland N., Holland D., Peng L.C., Kawagoe Y. (2000) – Genes and proteins involved in cellulose synthesis in plants – *Isr J. Plant Science*, 48, 165-171.

Delrot S., Atanassova R., Maurousset L. (2000) – Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters – *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465, 281-306.

- Denyer K., Dunlap F., Thorbjørnsen T., Keeling P., Smith A.M. (1996) – The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial – *Plant Physiology*, 112, 779-785.
- Doan D.N.P., Rudi H., Olsen O-A. (1999) – The allosterically unregulated isoform of ADP-glucose pyrophosphorylase from barley endosperm is the most likely source of ADP-glucose incorporated into endosperm starch – *Plant Physiology*, 121, 965-975.
- Druart N., De Roover J., Van den Ende W., Goupil P., Van Laere A., Rambour S. (2001) – Sucrose assimilation during early developmental stages of chicory (*Chicorium intybus* L) plants – *Planta*, 212, 436-443.
- Duffus C.M., Duffus J.H. (1984) – Carbohydrates metabolism in plants – Longman edition.
- Farré E.M., Geigenberger P., Willmitzer L., Trethewey R. (2000) – A possible role for pyrophosphate in the coordination of cytosolic and plastidial carbon metabolism within the potato tuber – *Plant Physiology*, 123, 681-688.
- Farré E.M., Tiessen A., Roessner U., Geigenberger P., Trethewey R.N., Willmitzer L. (2001) – Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugars, organic acids, amino acids, and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method – *Plant Physiology*, 127, 685-700.
- Fernie A.R., Willmitzer L., Trethewey R.N. (2002) – Sucrose to starch : a transition in molecular plant physiology – *Trends in Plant science*, 7, 1360-1385.
- Fu H., Park W.D. (1995) – Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato – *The Plant Cell*, 7, 1369-1385.
- Fu Y., Ballicora M.A., Leykam J.F., Preiss J. (1998) – Mechanism of Reductive Activation of Potato Tubers ADP-glucose Pyrophosphorylase – *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 25045-25052.
- Geigenberger P., M.Hajirezaei, M.Geiger, U.Deiting, U.Sonnenwald, M.Stitt (1998) – Overexpression of pyrophosphatase leads to increased sucrose degradation and starch synthesis, increased activities of enzymes for sucrose-starch interconversions, and increased levels of nucleotides in growing potato tubers – *Planta*, 205, 428-437.
- Geigenberger P., Stitt M. (2000) – Diurnal changes in sucrose, nucleotides, starch synthesis and AGPS transcript in growing potato tubers that are suppressed by decreased expression of sucrose phosphate synthase – *The Plant Journal*, 23(6), 795-806.
- Gerrits N., Turk S.C.H.J., Van Dun K.P.M., Hulleman S.H.D., Visser R.G.F., Weisbeek P.J., Smeekens S.C.M. (2001) – Sucrose Metabolism in Plastids – *Plant Physiology*, 125, 926-934.
- Greene T.W., Hannah L.C. (1998) – Enhanced stability of maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase is gained through mutants that alter subunit interactions – *Plant Biology*, 95, 13342-13347.
- Guerin J., Carbonero P. (1997) – The spatial distribution of sucrose synthase isozymes in barley – *Plant Physiology*, 114, 55-62.
- Guignard J-L (2000) – Biochimie végétale – Edition Dunod ; 2^{ème} édi., 116-131.
- Haigler C.H., Ivanova-Datcheva M., Hogan P.S., Salnikov V.V., Hwang S., Martin K., Delmer D.P. (2001) – Carbon partitioning to cellulose synthesis – *Plant Molecular Biology*, 47, 29-51.
- Halford N.G., Purcell P.C., Hardie D.G. (1999) – Is hexokinase really a sugar sensor in plants? – *Trends in plant science*, 99, 1360-1385.

- Hänggi E., Fleming A.J. (2001) – Sucrose Synthase expression pattern in young maize leaves : implication for phloem transport – *Planta*, 214, 326-329.
- Hylton C., Smith A.M. (1992) – The *rb* mutation of peas causes structural and regulatory changes in ADP glucose pyrophosphorylase from developing embryos – *Plant Physiology* 99, 1626-1634
- Kleczkowski L.A. (2000) – Is leaf ADP-glucose pyrophosphorylase an allosteric enzyme? – *Biochimica et Biophysica Acta*, 1476, 103-108.
- Koch K.E., Nolte K.D., Duke E.R., McCarty D.R., Avigne W.T. (1992) – Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes – *The Plant Cell*, 4, 59-69.
- Komatsu A., Moriguchi T., Koyama K., Omura M., Akihama T. (2002) – Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships - *Journal of Experimental Botany*, 53, 61-71.
- Krishnan H.B., Reeves C.D., Okita T.W. (1986) – ADP-glucose pyrophosphorylase is encoded by different mRNA transcripts in leaf and endosperm of cereals – *Plant Physiology*, 81, 642-645.
- Kutshera U., Heiderich A. (2002) – Sucrose metabolism and cellulose biosynthesis in sunflower hypocotyls – *Physiologia Plantarum*, 114, 372-379.
- Laughlin M.J., Chantler S.E., Okita T.W. (1998) – N- and C-terminal peptide sequences are essential for enzyme assembly, allosteric, and/or catalytic properties of ADP-glucose pyrophosphorylase – *The Plant Journal*, 14(2), 159-168.
- Lawlor D.W. (2001) – *Photosynthesis* – Bios scientific publishers Ltd, Oxford, U.K., 185-214.
- Li X., Xing J., Gianfagna T.J., Janes H.W. (2002) – Sucrose regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase subunit genes transcript levels in leaves and fruits – *Plant science*, 162, 239-244.
- Martin T., Frommer W.B., Salanoubat M., Willmitzer L. (1993) – Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs – *The Plant Journal*, 4(2), 367-377.
- Nakai T., Tonouchi N., Konishi T., Kojima Y., Tsuchida T., Yoshinaga F., Sakai F., Hayashi T. (1999) – Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum* - *PNAS*, 96, 14-18.
- Nakata P.A., Okita T.W. (1995) – Differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the sink and source tissue of potato – *Plant Physiology*, 108, 361-368.
- Nolte K.D., Koch K.E. (1993) – Companion-cell specific localization of sucrose synthase in zones of phloem loading and unloading – *Plant Physiology*, 101, 899-905.
- Pien S., Wyrzykowska J., Fleming A.J. (2001) - Novel marker genes for early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate metabolism within the apical meristem - *The Plant Journal*, 25(6), 663-674.
- Pollock C., Cairns A., Gallagher J., Farrar J., Tomos D., Koroleva O. (1999) – Sweetness and light : the role of sucrose in higher plants – *Iger Innovation*, 6-9.
- Pollock C.J. (1986) – Environmental effects on sucrose and fructan metabolism – *Current topics in plant biochemistry and physiology*, 5, 32-46.

- Preiss J. (1997b) – The chemistry and molecular biology of plant starch synthesis – Chemistry and technology, Ed 32 Academic press, New-York
- Rolletschek H., Hajirezaei M.-R., Wobus U., Weber H. (2002) – Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in *Vicia narbonensis* seeds increases soluble sugars and leads to higher water and nitrogen uptake – *Planta*, 214, 954-964.
- Rook F., Corke F., Card R., Munz G., Smith C., Bevan M.W. (2001) – Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling – *The Plant Journal*, 26(4), 421-433.
- Rouhier H., Usuda H. (2001) – Spatial and temporal distribution of sucrose synthase in the radish hypocotyl in relation to thickening growth – *Plant Cell Physiology*, 42(6), 583-593.
- Ruan Y.-L., Chourey P.S., Delmer D.P., Perez-Grau L. (1997) – The differential expression of sucrose synthase in relation to diverse patterns of carbon partitioning in developing Cotton Seed – *Plant Physiology*, 115, 375-385.
- Ruan Y.-L., Chourey P.S. (1998) – A fibreless seed mutation in cotton is associated with lack of fiber cell initiation in ovule epidermis and alterations in sucrose synthase expression and carbon partitioning in developing seeds – *Plant Physiology*, 118, 399-406.
- Salamone P.R., Kavakli I.H., Slattery C.J., Okita T.W. (2002) – Directed molecular evolution of ADP-glucose pyrophosphorylase – *PNAS*, 99, 1070-1075.
- Salnikov V.V., Grimson M.J., Delmer D.P., Haigler C.H. (2001) – Sucrose synthase localizes to cellulose synthesis sites in tracheary elements – *Phytochemistry*, 57, 823-833.
- Šebková V., Unger C., Hardegger M., Sturm A. (1995) – Biochemical, physiological, and molecular characterization of sucrose synthase from *Daucus carota*, *Plant Physiology*, 108, 75-83.
- Sheen J., Zhou L., Jang J.C. (1999) – Sugars as signalling molecules – *Current opinion in plant biology*, 2, 410-418.
- Shimizu Y., Aotsuka S., Hasegawa O., Kawada T., Sakuno T., Sakai F., Hayashi T. (1997) – Changes in levels of mRNAs for cell wall-related enzymes in growing cotton fiber cells – *Plant Cell Physiology*, 38(3), 375-378.
- Singh S., Choi S.-B., Modi M.K., Okita T.W. (2002) – Isolation and characterization of cDNA clones encoding ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) large and small subunits from chickpea (*Cicer arietinum* L.) – *Phytochemistry*, 59, 261-268.
- Sokolov L.N., Déjardin A., Kleczkowski L.A. (1998) – Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress) – *Biochemistry Journal*, 336, 681-687.
- Sturm A. (1996) – Molecular characterization and functional analysis of sucrose synthase cleaving enzymes in carrot (*Daucus carota* L.) – *Exp. Bot*, 47, 1187-1192.
- Sturm A., Lienhard S., Schatt S., Hardegger M. (1999) – Tissue-specific expression of two genes for sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) – *Plant Molecular Biology*, 39, 349-360.
- Sun J., Okita T.W., Edwards G.E. (1999) – Modification of carbon partitioning, photosynthetic capacity, and O₂ sensitivity in *Arabidopsis* plants with low ADP-glucose pyrophosphorylase activity – *Plant Physiology*, 119, 267-276.

Sweetlove L.J., Burrell M.M., Rees T. (1996) – Characterization of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers increased ADP glucose pyrophosphorylase – *Biochemistry Journal*, 320, 487-492.

Sweetlove L.J., Müller-Röber B., Willmitzer L., Hill S.A. (1999) – The contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis in potato tubers – *Planta*, 209, 330-337.

Tanase K., Shiratake K., Mori H., Yamaki S. (2002) – Changes in the phosphorylation state of sucrose synthase during development of Japanese pear fruit – *Physiologia Plantarum*, 114, 21-26.

Tanase K., Yamaki S. (2000) – Purification and characterization of two sucrose synthase isoforms from Japanese pear fruit – *Plant Cell Physiology*, 41(4), 408-414.

Van de Ende W., Michiels A., De Roover J., Van Laere A. (2002) – Fructan Biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development – *The scientific world journal*, 2, 1273-1278.

Vijn I., Smeekens S. (1999) – Fructan : more Than a reserve Carbohydrate ? – *Plant Physiology*, 120, 351-359.

Villand P., Olsen O.A., Kilian A., Kleczowski L.A. (1992) – ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit cDNA from barley endosperm – *Plant Physiology*, 100, 1617-1618.

Wang A-Y., Kao M-H., Yang W-H., Sayion Y., Liu L-F., Lee P-D., Su J-C. (1999) – Differentially and developmentally regulated of three rice sucrose synthase genes – *Plant Cell Physiology*, 40(8), 800-807.

Wang S-M., Lue W-L., Yu T-S., Long J-H., Wang C-N., Eimert K., Chen J. (1998) – Characterization of ADG1, an *Arabidopsis* locus encoding for ADPG pyrophosphorylase small subunit, demonstrates that the presence of the small subunit is required for large subunit stability – *The Plant Journal*, 13(1), 63-70.

Weber H., Buchner P., Borisjuk L., Wobus U. (1996) – Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase : expression patterns, metabolic regulation and implications for seed development – *The Plant Journal*, 9(6), 841-850.

Weschke W., Panitz R., Sauer N., Wang Q., Neubohn B., Weber H., Wobus U. (2000)- Sucrose transport into barley seeds : molecular characterization of two transporters and implications for seed development and starch accumulation - *The Plant Journal*, 21, 455-467.

Winter H., Huber J.L., Huber S.C. (1998) – Identification of sucrose synthase as an acting-binding protein – *FEBS Letters*, 430, 205-208.

Wittich P.E., Vreugdenhil D. (1998) – Localization of sucrose synthase activity in developing maize kernels by *in situ* enzyme histochemistry – *Journal of experimental Botany*, 49, 1163-1171.

Zeeman S.C., Tiessen A., Pilling E., Kato K.L., Donald A.M., Smith A.M. (2002) – Starch synthesis in *Arabidopsis*. Granule synthesis, composition, and structure – *Plant Physiology*, 129, 516-529.

Zeng Y., Wu Y., Avigne W.T., Koch K.E. (1999) – Rapid repression of maize invertases by low oxygen. Invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival – *Plant Physiology*, 121, 599-608.

Zrenner R., Salanoubat M., Willmitzer L., Sonnewald U. (1995) – Evidence of the crucial role sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) – *The Plant Journal*, 7(1), 97-107.